

Marsa Järvenpää, Annamari Rekiranta

# Grampositiivisten bakteerien antibioottiherkkyysmäärittysten verifiointi Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorilla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Terveys- ja hoitoala

Bioanalyytikko

Opinnäytetyö

25.10.2012

Tekijät Otsikko  Sivumäärä Aika	Marsa Järvenpää, Annamari Rekiranta Grampositiivisten bakteerien antibioottiherkkyysmääritysten verifiointi Vitek <sup>®</sup> 2-analysaattorilla 47 sivua + 6 liitettä 25.10.2012
Tutkinto	Terveys- ja hoitoala
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalyttikko (AMK)
Ohjaajat	Bioanalyttikko Iira Roslund Sairaalamikrobiologi Ritvaleena Puohiniemi Lehtori Tuula Kurkinen
<p>Potilaan bakteeri-infektion hoidon mikrobilääkeannostuksen suunnittelussa on erityisen tärkeää määrittää aiheuttajabakteerin sietokyky lääkelle. Bakteerien kehittämän antibiootiresistenssin lisääntyminen aiheuttaa hoidossa lisäkustannuksia, hoidon pidentymistä sekä lisää kuolleisuutta. Perinteisten lääkeherkkyysmenetelmien, kuten kiekko- ja E-testimenetelmien rinnalle on tullut analysaattoritoiminta. Tämä opinnäytetyö on tehty HUS-LABin klinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osastolle. Opinnäytetyömme tarkoituksena oli verifioida grampositiivisille bakteerilajeille tarkoitettuja antibioottiherkkyyskortteja Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorilla. Bakteriologian osastolla on aikaisempaa tutkimustulosta gramnegatiivisten bakteerien herkkyysmäärityksistä, joten opinnäytetyömme tulokset toivat paljon uutta tietoa grampositiivisten bakteerien osalta.</p> <p>Opinnäytetyömme näytteiden kokonaismäärä oli 102. Teimme kustakin lajista sekä bakteerin tunnistuksen identifikaatiokortilla (ID-GPC) että antibioottiherkkydet lajikohtaisilla korteilla (AST-P580, AST-P576, AST-ST01 ja AST-P586). Näytteet oli jaoteltu seuraavalla tavalla: <i>Staphylococcus aureus</i> (n=10), koagulaasinegatiiviset stafylokokit (n=10), MRSA eli metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus aureus</i> (n=10), <i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=20), <i>Streptococcus pyogenes</i> (n=4), <i>Streptococcus agalactiae</i> (n=4), C-, G-, <i>anginosus</i> ja <i>viridans</i> -ryhmän streptokokit (n=13), <i>Enterococcus faecalis</i> (n=9), <i>Enterococcus faecium</i> (n=12) sekä VRE eli vankomysiiniresistentti enterokokki (n=10).</p> <p>Vertasimme analysaattorin antamia tuloksia aiemmin kiekko- ja E-testimenetelmillä saatuihin tuloksiin. Tutkimuskysymykseksi muodostui ”Vastaavatko Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorin antamat antibioottiherkkyystulokset perinteisten menetelmien tuloksia.” Mahdollisten poikkeamien ilmenyttyä, teimme jatkotestaukset perinteisillä menetelmillä tulosten varmistamiseksi.</p> <p>Opinnäytetyömme tulosten perusteella voimme sanoa, että Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorin antamat antibioottiherkkyystulokset vastaavat hyvin perinteisillä menetelmillä saatuja vertailutuloksia. Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorin antamista antibioottiherkkyystuloksista 96,4 % vastasi perinteisillä menetelmillä saatuja tuloksia. Tuloksissa esiintyi neljä very major error-, kaksi major error- ja 17 minor error -virhettä. Eniten virheitä esiintyi enterokokkilajeilla. Tulosten pohjalta voidaan sanoa, että Vitek<sup>®</sup>2-analysaattori on käyttökelpoinen menetelmä grampositiivisten bakteerilajien antibioottiherkkyksiä määritettäessä.</p>	
Avainsanat	antibioottiherkkyys, Vitek2, grampositiivinen kokki

Authors Title Number of Pages Date	Marsa Järvenpää, Annamari Rekiranta Antibiotic Susceptibility Verification of Gram-positive Bacteria on Vitek®2-analyzer. 47 pages + 6 appendices 25 October 2012
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Iira Roslund, Biomedical Laboratory Scientist (HUSLAB) Ritvaleena Puohiniemi, Clinical Microbiologist (HUSLAB) Tuula Kurkinen, Senior Lecturer
<p>When planning an antibiotic treatment on a patient's bacterial infection, it is vital to define the bacteria's susceptibility to the drug. The increase of antibiotic resistance that bacteria have generated causes more expenses to the health care, lengthens treatment and raises death rate. The use of analyzers has become part of everyday work in addition to traditional antibiotic susceptibility tests such as method of antibiotic disc and E-test. Our final project was made in HUSLAB's clinical microbiology for bacteriology's department. The purpose of our final project was to verify antibiotic susceptibility cards of gram-positive bacteria for Vitek®2-analyzer. The bacteriology department already had susceptibility research data of gram-negative bacteria, so our final project brought new data regarding the gram-positive bacteria.</p> <p>We had a total of 102 samples of gram-positive bacteria that were studied. We identified bacteria with identification card (ID-GPC) and antibiotic susceptibility with species-specific cards (AST-P580, AST-P576, AST-ST01 and AST-P586) from each strain. Our sample collection included <i>Staphylococcus aureus</i> (n=10), coagulase negative staphylococcus (n=10), MRSA alias methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (n=10), <i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=20), <i>Streptococcus pyogenes</i> (n=4), <i>Streptococcus agalactiae</i> (n=4), C-, G-, <i>anginosus</i> and <i>viridans</i> -group streptococcus (n=13), <i>Enterococcus faecalis</i> (n=9), <i>Enterococcus faecium</i> (n=12) and VRE alias vancomycin resistant enterococci (n=10).</p> <p>We compared the analyzer's results to earlier results that were received by antibiotic disc- and E-test methods. Our research question was "Will Vitek®2-analyzer's antibiotic susceptibility results correspond to those of traditional antibiotic susceptibility tests' results." When we got some deviation of results we reanalyzed those samples with traditional methods.</p> <p>Based on the results we got in our final project, we may say that the results Vitek®2 - analyzer gave us corresponded well to the results of the traditional methods. About 96.4% of the results corresponded perfectly to the results that were received by traditional methods. We had four very major errors, two major errors and seventeen minor errors in our tests. Most of the errors occurred in enterococcus samples. According to the results, we may say Vitek®2-analyzer is a useful method when defining antibiotic susceptibility of gram-positive bacteria.</p>	
Keywords	antimicrobial susceptibility, Vitek2, gram-positive cocci

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Tutkimuksessa käytettävät bakteerikannat	2
2.1	Stafylokokit	2
2.2	Streptokokit	3
2.3	Enterokokit	5
3	Antibiootit	6
3.1	Soluseinään vaikuttavat antibiootit	7
3.2	Proteiinisynteesiin vaikuttavat antibiootit	9
3.3	Nukleiinihapposynteesiin vaikuttavat antibiootit	12
3.4	Antibioottiresistenssi	13
4	Vitek®2-analysaattori	15
4.1	Bakteerilajien tunnistus	15
4.2	Antibioottiherkkyuden määrittäminen	16
4.3	Aikaisemmat tutkimukset	18
5	Toteutus	22
6	Tulokset	28
6.1	Stafylokokkikortti AST-P580	29
6.2	Pneumokokkikortti AST-P576	31
6.3	Streptokokkikortti AST-ST01	31
6.4	Enterokokkikortti AST-P586	33
6.5	Yhteenveto	35
7	Tulosten luotettavuuden arviointi ja toistettavuus	39
8	Pohdinta	41
	Lähteet	45
	Liitteet	
	Liite 1. Herkkyyskorttien sisältämät antibiootit	
	Liite 2. Stafylokokkikortti AST-P580 tulokset	
	Liite 3. Pneumokokkikortti AST-P576 tulokset	

Liite 4. Streptokokkikortti AST-ST01 tulokset

Liite 5. Enterokokkikortti AST-P586 tulokset

Liite 6. Esimerkki Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorin tuloksista

## 1 Johdanto

Bakteriologiset laboratoriotutkimukset ovat olennainen osa selvitettäessä potilaan sairastumisen syytä. Laboratoriotutkimuksilla voidaan selvittää, onko kyseessä infektio tauti ja miten hoito olisi mahdollisimman tehokasta. Koska bakteeri-infektioita hoidetaan mikrobilääkkeillä, on olennaista selvittää lääkityksen teho antibioottiherkkyyismäärityksillä. (Carlson – Koskela 2011: 37.) Bakterien kehittämä antibiootiresistenssi luo kuitenkin haasteita potilaiden hoitoon. Resistenssi voi olla luonnollista tai hankittua. Hankitussa resistenssissä luonnostaan herkkä bakteeri muuttuu resistentiksi joko geenien muutoksien tai siirtymisen seurauksena. Geenimuutoksen johdosta bakteerille syntyy kyky muunnella bakteerilääkkeen vaikutuskohtia. (Järvinen – Vaara – Huovinen – Liippo – Vasankari 2011: 122.) Uusia lääkkeitä kehitetään jatkuvasti, mutta bakteerien evoluutio on nopeaa (Vaara 2009: 2001).

Suomessa mikrobilääkeresistenssiä tutkii FiRe-tutkimusryhmä (Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance). Tutkimusryhmän ensisijaisena tehtävänä on tuottaa luotettavaa ja vertailukelpoista tietoa bakteerien lääkeresistenssin esiintyvyydestä. FiRe siirtyi EUCAST- (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) standardiin vuonna 2011. (FiRe 2011.) EUCAST vastaa Euroopan laajuisesti kaikista antibioottiherkkyyismääritysten teknisistä näkökohdista sekä määrittää raja-arvot MIC-määrityksille (EUCAST 2012).

Antibioottiherkkyyismäärityksille on kehitetty monta menetelmää. Perinteisen kiekko-menetelmän rinnalle ovat tulleet muun muassa kaupalliset E-testiliuskat (Epsilon-testi) sekä analysaattoritoiminta. Menetelmästä riippumatta tulosten tulkinta on sama perustuen SIR-tulkintaan (susceptible-intermediate-resistant). Työmme tarkoituksena oli verifioida antibioottiherkkyyiskortteja grampositiivisille bakteereille Vitek®2-analysaattorilla. Vitek®2-analysaattori on automatisoitu menetelmä bakteeri- ja hiivalajien nimeämiseen sekä antibioottiherkkyyden määrittämiseen. Verifiointi on osa laadunvalvontaa. Verifiointilla tarkoitetaan todentamista eli toisin sanoen tarkistetaan tuotteen tai menetelmän toimivuutta.

HUSLABin kliinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osastolla on aikaisempaa tutkimustulosta gramnegatiivisten bakteerien herkkyyismäärityksistä Vitek®2-analysaattorilla, joten tämä työ tuo paljon uutta tietoa grampositiivisten bakteerien osalta.

ta (Roslund 2012). Tästä muodostuikin tutkimuskysymyksemme ”Vastaavatko Vitek®2-analysaattorin antamat antibioottiherkkyystulokset perinteisten menetelmien tuloksia.” Työvaiheemme koostuivat esitutkimuksesta ja varsinaisesta toteutusvaiheesta. Opin- näytetyömme toimeksiantajana toimi HUSLABin bakteriologian osasto. Työelämän ohjaajina toimivat bioanalyytikko Iira Roslund ja mikrobiologi Ritvaleena Puohiniemi sekä opettajaohjaajana Tuula Kurkinen.

## 2 Tutkimuksessa käytettävät bakteerikannat

Yksi tärkeimmistä ja ensisijaisista bakteerien tunnistusmenetelmistä on gramvärjäys, jossa bakteerit erotetaan grampositiivisiin ja -negatiivisiin bakteerin soluseinän raken- teen perusteella. Grampositiivisen bakteerin seinä on huomattavasti paksumpi kuin gramnegatiivisen. Soluseinä koostuu peptidoglykaanikerroksista, joita grampositiivisella bakteerilla on useita kymmeniä päällekkäin ja gramnegatiivisella vain yhdestä kolmeen. (Vaara – Skurnik – Sarvas 2010: 21–22.) Gramvärjäyksessä objektilasille kiinnitetyt näytteet värjätään kristalliviolettiliuoksella ja safraniinilla. Grampositiiviset bakteerit vär- jäytyvät violetin värisiksi ja gramnegatiiviset näkyvät punaisena. (Carlson – Koskela 2011: 38–39.) Värjäytyvyys perustuu erilaisiin solunseinärakenteisiin. Kristallivioletti väri jää grampositiivisen bakteerin sisään, kun sen solunseinät kutistetaan alkoholi tai asetonikäsittelyllä. Gramnegatiivisesta väri huuhtoutuu pois. (Puhakka - Salkinoja- Salonen 2002: 101.) Kaikki opinnäytetyössämme käytetyt bakteerikannat olivat gram- positiivisia.

### 2.1 Stafylokokit

*Staphylococcus aureus* löytyy usein ihmisiltä nenästä ja nenänielusta, joskus myös iholta. *Staphylococcus aureus* voi levitä kosketus- tai aerosolitartuntana ja käyttää tar- tuntareittinään esimerkiksi rikkinäistä ihoa ja haavoja. *Staphylococcus aureus* aiheuttaa yleisimmin iho- ja pehmytkudosinfektioita, mutta myös vakavia yleisinfektioita, kuten esimerkiksi sepsiksen ja endokardiitin. Stafylokokit ovat koagulaasinegatiivisia baktee- reita, joista kuitenkin *Staphylococcus aureus* on poikkeus. Se voidaan erottaa helposti muista saman ryhmän bakteereista koagulaasitestillä. Testissä bakteeria kasvatetaan plasman läsnä ollessa ja jos plasma hyytyy, on bakteeri koagulaasiposiitivinen. (Vuo- pio-Varkila – Kuusela – Kotilainen 2010: 83.) Koagulaasinegatiiviset stafylokokit aiheut- tavat eniten ongelmia mikrobiologian laboratoriossa tilanteissa, joissa pyritään erotta- maan kliinisesti merkittävät patogeenit kontaminaatioista. Opinnäytetyössämme käy-

timme koagulaasinegatiivisista stafylokokkeista *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* sekä *Staphylococcus capitis* -lajeja.

MRSA eli metisilliinille resistentti *Staphylococcus aureus* aiheuttaa samankaltaisia infektioita kuin tavallinen *Staphylococcus aureus*. Näissä infektioissa hoito on kuitenkin vaikeutunut, sillä *Staphylococcus aureus* on kehittänyt antibiooteille resistenttejä kantoja. MRSA:n kromosomissa sijaitseva *mecA*-geeni tuottaa penisilliiniä sitovaa proteiinia, joka saa aikaan bakteerin vastustuskyvyn useimmille stafylokokkipenisilliineille. Näitä ovat muun muassa metisilliini, oksasilliini, kloksasilliini sekä dikloksasilliini. Myös muut beetalaktaamit ovat tehottomia MRSA-infektion hoidossa. (Agthe ym. 2004.) MRSA-infektioiden hoidossa käytetään ensisijaisesti vankomysiiniä ja teikoplaniinia (Vuopio-Varkila ym. 2010: 94). Vuonna 2012 elokuun puoliväliin mennessä Suomen laboratoriot ovat ilmoittaneet yhteensä 711 uutta MRSA-kantajatapausta ja MRSA-löydöksiä verestä tai likvorista oli 18 (Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta 2012).

## 2.2 Streptokokit

*Streptococcus pneumoniae* eli pneumokokki on yleinen keuhkokuumeen sekä välikorvatulehduksen aiheuttava kokkibakteeri. Pneumokokin taudinaiheuttamiskyvyn kannalta keskeinen tekijä on soluseinän polysakkaridikapseli, joka estää tehokkaasti fagosytoosia. Pneumokokki-infektio voi aiheuttaa vakavan ja jopa kohtalokkaan sairastumisen immuunipuutteisilla ja iäkkäillä henkilöillä. Pneumokokki voidaan erottaa muista alfa-hemolyyttisistä streptokokeista optokiiniekolla, joka spesifisesti estää pneumokokin kasvun. (Kauma – Virolainen-Julkunen 2010: 112–116.) Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen julkaiseman raportin mukaan vuonna 2011 suoritettiin antibioottilääkeherkkyys 780 pneumokokkikannalle, joista 22 % oli penisilliinille herkkydeltään alentuneita ja täysin resistenttejä 0,3 %. Moniresistenttien kantojen esiintyvyys oli 2,8 %. Penisilliinille resistenttien kantojen määrän lasku aiemmista vuosista johtuu ilmeisimmin siirtymisestä EUCAST:n herkkyysrajoihin. (Lyytikäinen – Jalava – Siira – Virolainen-Julkunen 2012.)

Pisara- ja kosketusteilse tarttuva A-ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki, *Streptococcus pyogenes*, on yksi tärkeimmistä taudinaiheuttajista. Tavallisin A-streptokokin aiheuttama tauti on nielurisatulehdus eli tonsilliitti, mutta se voi aiheuttaa myös iho- ja pehmytkudosinfektioita, sepsiksen sekä jälkitauteja akuutin infektion jälkeen. A-



streptokokin aiheuttama infektio voidaan osoittaa viljelyllä tai vieritestillä. Viljelyssä verimaljalla kasvava beetahemolyyttinen streptokokki eroaa muusta kasvustosta kirkkaan hemolyysinsä ansiosta. Kuitenkin myös monet muut streptokokit voivat saada maljalla aikaan hemolyysiä. Käytössä on myös A-streptokokin antigeenin suora osoitus vieritestillä, mutta eri testien luotettavuudessa on suuria eroja. (Vuopio-Varkila – Syrjänen – Kotilainen 2010: 102–108.) Ensisijainen hoidossa käytettävä antibiootti on penisilliini, mutta allergisilla voidaan käyttää myös ensimmäisen polven kefalosporiineja tai klindamysiinia (Ruotsalainen 2009).

Alemman suoliston ja emättimen normaaliflooraan kuuluva B-ryhmän beetahemolyyttinen *Streptococcus agalactiae* aiheuttaa usein infektioita vastasyntyneille. Infektio alkaa joko 20 tunnin sisällä (early onset) tai 1-12 viikkoa synnytyksestä (late onset). Aikuisilla B-streptokokit voivat aiheuttaa erilaisia infektioita iho- ja pehmytkudosinfektioista aivokalvontulehdukseen. Bakteeri voidaan helposti tunnistaa lateksiagglutinaatio- ja biokemiallisilla testeillä. Hoidossa on käytössä ensisijaisesti penisilliini. (Saxén – Vuopio-Varkila 2010: 110–111.)

C- ja G-ryhmien streptokokit ovat opportunistipatogeeneja, jotka elävät ihmisen normaalimikrobistossa. Ne kykenevät kuitenkin aiheuttamaan infektion muun muassa nielurisoihin, ihoon sekä verenkiertoon. Kliinisten näytteiden vastauksissa tulos annetaan pinta-antigeenien mukaan ”C- tai G-ryhmän streptokokki” eli tarkempaa lajintunnistusta ei tehdä. Hoidossa käytetään muiden streptokokkien tapaan ensisijaisesti penisilliiniä. (Rantakokko-Jalava – Anttila 2010: 122–125.) Tämän ryhmän lajeista käytimme opinnäytetyössämme muun muassa *Streptococcus dysgalactiae* ja *Streptococcus equi*-näytteitä.

Opinnäytetyöhömme kuului myös *Streptococcus anginosus*- ja viridans-ryhmiin kuuluvia streptokokkeja. Taksonomisesti *Streptococcus anginosus* kuuluu viridans-ryhmään. (Rantakokko-Jalava – Anttila 2010: 123–125.) Taksonomia tarkoittaa eliöitä luokittelevaa tieteenalaa. Bakteerit voidaan luokitella ryhmiin samankaltaisuuden tai sukulaisuuden mukaisesti. (Lindholm – Eerola 2010: 56.) Näiden ryhmien streptokokit ovat useimmiten alfa- tai ei-hemolyyttisiä ja aiheuttavat endokardiitteja. Näiden ryhmien streptokokit ovat hyvin avirulentteja, mutta tilaisuuden tullen voivat aiheuttaa vakavia infektioita päästessään limakalvoilta verenkiertoon. Viridans-streptokokkeihin tehoaa hyvin mikrobilääkitys. (Rantakokko-Jalava – Anttila 2010: 122–125.) Opinnäytetyös-

sämme oli mukana muun muassa *Streptococcus mitis* ja *Streptococcus anginosus* -näytteitä.

### 2.3 Enterokokit

Enterokokit ovat fakultatiivisesti anaerobeja ja kasvuvaatimuksiltaan hyvin joustavia. Ne pystyvät kasvamaan hyvin suolaisessa ympäristössä, laajalla lämpötila-alueella sekä korkeassa pH:ssa. Enterokokit luokitellaan Lancefieldin D-ryhmään, mutta ne erotettiin muista streptokokeista 1980-luvun puolivälissä. Enterokokit kuuluvat suolen normaalimikrobistoon ja niitä voidaan löytää myös urogenitaali-alueelta ja pieninä määrinä suusta. Infektion aiheuttajina enterokokit ovat opportunisteja ja ne säilyvät jopa päiviä hengissä elottomilla pinnoilla. Tavallisin enterokokin aiheuttama tulehdus on virtsatieinfektio ja yleensä infektio on lähtöisin potilaan omasta mikrobistosta. Potilasnäytteistä eristetyistä kannoista yli 95 % on *Enterococcus faecalis*- ja *Enterococcus faecium* -lajeja, joita käytimme myös omassa työssämme. Enterokokit ovat luontaisesti resistenttejä useimmille antibiooteille, jonka takia ne menestyvätkin hyvin sairaaloissa. Enterokokkien proteiinien muuntelukyky auttaa niitä hankkimaan luontaisen resistenssin lisäksi resistenssin muun muassa beetalaktaameille. Kuitenkin beetalaktaami- ja aminoglykosidiryhmien antibioottien yhdistelmä enterokokki-infektioiden hoidossa vaikuttaa synergisesti eli ne vahvistavat toistensa vaikutusta. Tällöin yhteisvaikutus on bakterisidinen eli bakteereita tappava. Yksinään beetalaktaamin vaikutus on korkeintaan bakteriostaattinen eli bakteerin kasvua estävä. (Rantakokko-Jalava – Anttila 2010: 126–127.)

VRE eli vankomysiiniresistentti enterokokki on nimensä mukaisesti kehittänyt vastustuskyvyn vankomysiinille ja usein myös sen sukulaiselle teikoplaniinille, jolloin infektion hoito vaikeutuu. VRE aiheuttaa MRSA:n kaltaisia sairaalaepidemioita henkilökunnan käsien välityksellä. (Kainulainen – Lyytikäinen – Vuopio-Varkila – Syrjälä 2006: 22–23.) Enterokokit voivat hankkia resistenssin glykopeptideille *vanA*- ja *vanB*-geenien välityksellä. *VanA* ilmentää resistenssiä vankomysiinille ja teikoplaniinille, *vanB* vain vankomysiinille. *VanC*-geeni on luonnostaan *Enterococcus casseliflavus* ja *Enterococcus gallinarum* -lajeilla, eikä sen välittämää resistenssiä ole todettu siirtyvän muihin bakteerilajeihin. *VanC*-kantojen herkkyyys vankomysiinille on luonnostaan alentunut. Infektioiden hoitoon on käytetty uusia mikrobilääkkeitä, kuten linetsolidia ja tigesykliinia. (Rantakokko-Jalava – Anttila 2010: 127–128.) Opinnäytetyössämme oli mukana *vanC*-geenin omaavat *Enterococcus casseliflavus* ja *Enterococcus gallinarum*.

### 3 Antibiootit

Käytimme opinnäytetyössämme neljää erilaista antibioottikorttia. Jokaiseen korttiin on sisällytetty erilaisia antibiootteja, joiden avulla bakteerien antibioottiherkkyyden määrittäminen on mahdollista. Korttien sisältämät antibiootit on esitelty taulukoituna liitteessä 1. Jokaiselle bakteerilajille on oma herkkyyskorttinsa, joissa on myös määritetty MIC-alueet. MIC eli minimal inhibitory concentration kertoo bakteerilääkkeen pienimmän bakteerinkasvun estävän pitoisuuden (Carlson – Koskela 2011: 43).

Bakteerilääkkeet luokitellaan pääasiallisesti neljään eri ryhmään niiden vaikutusmekanismien mukaan. Luokitus riippuu siitä, mihin kohteeseen mikrobilääke vaikuttaa. Ensimmäiseen ryhmään luetaan ne lääkkeet, jotka vaikuttavat bakteerin soluseinämän peptidoglykaanisynteesiin. Peptidoglykaani on bakteerin soluseinässä sijaitseva jättimolekyyli, joka vaikuttaa bakteerin soluseinän mekaaniseen lujuuteen. Ensimmäisen ryhmän bakteerilääkkeet vaikuttavat tämän jättimolekyylin synteesiin esimerkiksi estämällä erilaisten entsyymien toimintaa. (Järvinen ym. 2011: 114–116.)

Toiseen ryhmään kuuluvat mikrobilääkkeet, jotka vaikuttavat bakteerien proteiinisynteesiin translaatiovaiheessa. Suurin osa proteiinisynteesiin vaikuttavista lääkkeistä on bakteriostaattisia ja näin ollen kyseisten lääkkeiden vaikutus on monesti tilapäinen. Bakteerin proteiinisynteesi pääsee käynnistymään uudelleen, mikäli bakteerit pääsevät jälleen lääkkeettömään ympäristöön. (Järvinen ym. 2011: 116–117.)

Kolmannen ryhmän muodostavat mikrobilääkkeet, jotka vaikuttavat nukleiinihappojen synteesiin. Tämän ryhmän bakteerilääkkeet sitoutuvat joko bakteerin DNA:han tai RNA:han. (Järvinen ym. 2011: 117.)

Neljänteen ryhmään luokitellaan ne mikrobilääkkeet, jotka vaikuttavat bakteerien sytoplasmiseen kalvoon. Sytoplasmista kalvoa vaurioittavien lääkkeiden haittana on se, että ne vaikuttavat myös terveisiin soluihin haitallisesti. (Järvinen ym. 2011: 117.)

Jaottelimme opinnäytetyömme antibiootit kolmeen ryhmään niiden vaikutusmekanismien mukaisesti. Jätimme sytoplasmiseen kalvoon vaikuttavien antibioottien käsittelyn kokonaan pois työstämme, sillä käytössämme ei ollut yhtään tähän ryhmään kuuluvia antibiootteja. Seuraavissa kappaleissa on esitelty opinnäytetyömme antibioottiherkkyydskorttien sisältämät antibiootit.

### 3.1 Soluseinään vaikuttavat antibiootit

Beetalaktaameihin luetaan kuuluvaksi kefalosporiinit, penisilliinit ja muutama muu beetalaktaamirakenteinen bakteerilääke, muun muassa atsreonaami ja karbapeneemit. Beetalaktaamit sitoutuvat useisiin bakteerin peptidoglykaanisynteesin loppuvaiheen entsyymeihin. Beetalaktaamirakenteiset lääkkeet ovat kaikki bakterisidisia ja vaikuttavat yleisimmin kasvaviin soluihin. Beetalaktaamit poistuvat elimistöstä erittymällä virtsaan ja pääasiallisesti niiden puoliintumisaika on melko lyhyt. Lyhyen puoliintumisaajan johdosta beetalaktaameja tulee annostella potilaalle useaan otteeseen, jotta tarvittava lääkkeen pitoisuus pysyy yllä infektiopesäkkeissä. Mikäli lääkeannos pääsee laskemaan bakteereiden kasvua hillitsevän rajan alle, pääsevät bakteerit taas jatkamaan kasvuaan. Beetalaktaamien terapeutinen leveys on suuri ja näin ollen toksisiin pitoisuuksiin päätyminen vaatii isoja lääkeannoksia. Suuren terapeuttisen leveytensä ansiosta beetalaktaameja voidaankin käyttää melko turvallisesti myös raskauden ja imetyksen aikana. (Järvinen ym. 2011: 136–137.)

Penisilliinit kuuluvat beetalaktaamien ryhmään. Ensimmäinen löydetty penisilliini on lähtöisin *Penicillium notatum* -homeesta, joka löydettiin vuonna 1929. Penisilliini otettiin kuitenkin hoitokäyttöön vasta 1940 luvulla. (Järvinen ym. 2011: 137–138; Wecker – Crespo – Dunaway – Faingold. – Watts 2010: 528.) Muut penisilliinit on tämän jälkeen tuotettu luonnollisista penisilliineistä puolisynteettisesti muuntelemalla penisilliinin rakennetta. Nykyään penisilliinejä on edelleen käytössä, mutta niiden käyttö on vähentynyt muun muassa resistenttien bakteerikantojen synnyn myötä. Oksasilliini otettiin käyttöön korvaamaan metisilliini. Sillä pyrittiin vähentämään sairaalabakteeri MRSA:ta. (Järvinen ym. 2011: 137–138.) Antibioottikorteissamme esiintyy penisilliinijohdos oksasilliini.

Peruspenisilliineihin kuuluu G-penisilliini eli bentsyylipenisilliini. G-penisilliiniä käytetään nykyisin vain sairaalahoidossa suoraan suoneen annosteltavana muotona, sillä se hajoaa herkästi mahalaukussa matalassa pH:ssa (Wecker ym. 2010: 532; Järvinen ym. 2011: 138–141.) Peruspenisilliineille herkkiä bakteerikantoja ovat muun muassa beeta-hemolyyttiset streptokokit, anaerobiset grampositiiviset kokkibakteerit, *anginosus*- ja viridans-ryhmän streptokokit sekä *Neisseria meningitidis* (Järvinen ym. 2011: 138–141).

Amoksisilliini ja ampisilliini kuuluvat aminopenisilliineihin, jotka ovat paljon käytössä avohoidon puolella. Kyseisiä lääkkeitä käytetään ylempien hengitysteiden infektioiden hoidossa. Aminopenisilliinit kuuluvat laajakirjoisten mikrobilääkkeiden joukkoon. Ne ovat myös happoja kestäviä, minkä johdosta ne soveltuvatkin erinomaisesti suun kautta otettaviksi. Pääasiallisesti aminopenisilliinit tehoavat samoihin bakteereihin kuin peruspenisilliinit. Erona on kuitenkin se, että niiden laajakirjoisuus kattaa myös monia kliinisesti merkittäviä gramnegatiivisia bakteereita. Aminopenisilliinit tehoavat myös moniin enterokokkeihin. (Järvinen ym. 2011: 141–143.)

Kefalosporiinit ovat penisilliinien tavoin rakenteeltaan beetalaktaameja. Nämä mikrobilääkkeet ovat puolisynteettisiä johdannaisia, jotka on valmistettu *Cephalosporium*-homeen erittämästä antibiootista. Kefalosporiinit jaetaan yleensä neljään eri sukupolveen historiallisin perustein. Sukupolviin jako kuvastaa lääketieteen pyrkimystä kehittää uusia tehokkaampia mikrobilääkkeitä, etenkin gramnegatiivisiin sauvoihin tehoavia. Eri sukupolven kefalosporiinit jaetaan vielä parentaaliin ja oraalisiin kefalosporiineihin. (Järvinen ym. 2011: 145–149.)

Toisen sukupolven kefalosporiineista antibioottikorteissamme esiintyy kefuroksiimi. Kefuroksiimi tehoaa streptokokkeihin sekä neisserioihin ja hemofilukseen. Kefuroksiimi tehoaa myös stafylokokkeihin, lukuunottamatta *Staphylococcus aureus*. Kefuroksiimia käytetään laajalti sairaaloissa, kun epäillään yleisinfektiota, jossa infektion aiheuttajakkeeria ei ole saatu selville tai infektion tarkka sijainti ei ole selvinnyt. (Järvinen ym. 2011: 149–150.)

Kolmannen sukupolven kefalosporiineista antibioottikorteissamme esiintyy kefotaksiimi ja keftriaksoni. Nämä molemmat mikrobilääkkeet lukeutuvat antotapansa mukaan parentaaliin kefalosporiineihin. Kolmannen sukupolven teho gramnegatiivisiin bakteereihin on suurempi kuin toisen polven, mutta samanaikaisesti niiden teho muun muassa *Staphylococcus aureus* on heikentynyt. Monet bakteerilajit, jotka ovat kyenneet saamaan itselleen R-plasmidin, ovat muuttuneet resistenteiksi monille kolmannen sukupolven kefalosporiineille. R-plasmidi mahdollistaa bakteereille kyvyn hajottaa kolmannen polven kefalosporiineja. (Järvinen ym. 2011: 150–152.) Plasmidit ovat bakteerin varsinaisen genomien ulkopuolella sijaitsevia DNA-molekyylejä, jotka sisältävät eri ominaisuuksia koodaavia geenejä. R-plasmidit vaikuttavat bakteerin antibioottiresistenssiominaisuuksiin. (Skurnik 2010: 47–48.)

Karbapeneemit ovat puolisynteettisiä johdoksia *Streptomyces cattleyan* tuottamasta tienamysiinistä. Karbapeneemit muistuttavat rakenteeltaan penisilliinejä ja niillä on laajin antibakteerinen kirjo kaikista beetalaktaameista. Karbapeneemit tehoavat muun muassa stafylokokkeihin, useimpiin streptokokkeihin ja gramnegatiivisiin enterobakteerikantoihin, hemofiluksiin, *Acinetobacter*-kantoihin, anaerobeihin bakteerikantoihin ja neisserioihin. Poikkeuksena stafylokokkeissa ovat metisilliiniresistentit stafylokokit, jotka ovat resistenttejä karbapeneemeille. Karbapeneemeistä opinnäytetyömme antibiootikorteissa esiintyy imipeneemi. Imipeneemi tehoaa hieman paremmin grampositiivisiin bakteereihin kuin muut karbapeneemit. Joillakin bakteerikannoilla on alkanut esiintyä entsyymejä, jotka hajottavat karbapeneemejä. (Järvinen ym. 2011: 152–154.)

Glykopeptidien ryhmän mikrobilääkkeistä antibiootikorteissamme esiintyivät vankomysiini ja teikoplaniini. Molemmat lääkkeet vaikuttavat peptidoglykaanisynteesiin estämällä bakteerin soluseinämän syntymistä. Vankomysiini ja teikoplaniini muistuttavat toisiinsa myös teholtaan. (Järvinen ym. 2011: 175–177.) Molemmat vaikuttavat vain grampositiivisiin bakteereihin, sillä niiden suuri molekyyilirakenne estää niitä läpäisemästä gramnegatiivisten bakteereiden ulointa solukalvoa. Vankomysiini kuuluu bakterisidisiin mikrobilääkkeisiin. (Wecker ym. 2010: 537.) Herkkiä tämän ryhmän lääkkeille ovat myös monet multiresistentit stafylokokit. Tosin kummallekin lääkkeelle on jo ehtinyt kehittyä resistenttejäkin bakteerikantoja, mutta nämä kannat ovat vielä melko harvinaisia Suomessa. (Järvinen ym. 2011: 175–177.)

### 3.2 Proteiinisynteesiin vaikuttavat antibiootit

Makrolidit sitoutuvat bakteereiden ribosomien 50S alayksikköön (Wecker ym. 2010: 543). Makrolidien perusrakenteena on makrosyklinen laktonirengas. Tämän renkaan muokkaamisen johdosta makrolidimikrobilääkkeiden välillä on eroavaisuuksia farmakokinetiikassa ja aktiivisuudessa. Erytromysiini tehoaa lähes kaikkiin grampositiivisiin bakteereihin. (Järvinen ym. 2011: 155–158.) Erytromysiini oli myös mukana opinnäytetyössämme.

Ketolidit on muokattu erytromysiinistä sen rengasrakennetta muuttamalla. Telitromysiini on ensimmäinen valmistettu ketolidiryhmän mikrobilääke. Ketolidit vaikuttavat pääasiallisesti samoihin bakteerikantoihin kuin makrolidit. Myös *Moraxella catarrhalis* on herkkä ketolideille. Ketolideilla on kaksi mahdollista sitoutumiskohtaa bakteereiden ribosomissa makrolidien yhden sitoutumiskohdan sijaan. (Järvinen ym. 2011: 158–159.)

Klindamysiini sitoutuu bakteerien ribosomeihin estäen niiden proteiinisynteesiä. Klindamysiini luokitellaan bakteriostaattiseksi mikrobilääkkeeksi. Pääasiallisesti klindamysiini tehoaa grampositiivisiin bakteereihin ja anaerobibakteerikantoihin. Tärkeimmät herkät lajit ovat *Streptococcus pyogenes* ja *Staphylococcus aureus*. Klindamysiini tehoaa myös useisiin anaerobisiin gramnegatiivisiin sauvoihin. Klindamysiini tunkeutuu erittäin hyvin luuhun, märkäonteloihin, kudoksiin ja lisäksi se konsentroituu muun muassa valkosoluihin. (Järvinen ym. 2011: 159–160.)

Tetrasykliinit on eristetty *Streptomyces*-kannoista ja ne ovat hyvin laajakirjoisia bakteerilääkkeitä. Tetrasykliinit ovat bakteriostaattisia ja ne vaikuttavat bakteerien proteiinisynteesiin estäen sitä. (Järvinen ym. 2011: 160–162.) Tetrasykliineistä opinnäytetyössämme oli mukana tetrasykliini ja tigesykliini. Nämä mikrobilääkkeet käyttävät sitoutumiskohtana bakteerien ribosomien 30S-alayksikköä (Wecker ym. 2010: 543). Erittäin monet bakteerit ovat herkkiä tetrasykliineille. Valitettavasti runsas tetrasykliinien käyttö on saanut aikaan joissakin bakteeriryhmissä R-plasmidivälitteisen resistenssin lisääntymisen. Tigesykliini on tetrasykliinijohdos, joka tehoaa hyvin stafylokokkeihin. Tigesykliini tehoaa myös hyvin grampositiivisista bakteereista streptokokkeihin, pneumokokkeihin ja enterokokkeihin. (Järvinen ym. 2011: 160–162.)

Aminoglykosidi-ryhmän mikrobilääkkeet estävät bakteerien proteiinisynteesiä sitoutumalla niiden ribosomeihin. Tämän ryhmän lääkkeet luetaan bakterisidisiin lääkkeisiin. Aminoglykosidit ovat toksisia mikrobilääkkeitä, minkä takia niitä käytetään pääasiallisesti vain bakteremian (bakteereita verenkierrrossa) ja sepsiksen hoidossa. (Wecker ym. 2010: 543.) Antibioottikorteissamme esiintyy tämän ryhmän mikrobilääkkeistä tobramysiini ja gentamysiini. Aminoglykosidit tehoavat hyvin gramnegatiivisiin bakteereihin, etenkin enterobakteereihin. Grampositiiviset stafylokokit ovat myös melko herkkiä aminoglykosidi-ryhmän mikrobilääkkeille. Aminoglykosideillekin on syntynyt aikojen kuluessa resistenttejä bakteerikantoja. Monissa tapauksissa resistenssin aiheuttaa R-plasmidi. Yksi esimerkki bakteereiden resistenssimekanismeista aminoglykosideille on soluseinän muutos, joka estää aminoglykosidien läpi pääsyä tai kuljetusta. Toinen esimerkki resistenssimekanismeista on ribosomien muutos, jolloin lääkkeiden sitoutuminen bakteereiden ribosomeihin estyy tai vaikeutuu heikentäen lääkkeiden vaikutusta. (Järvinen ym. 2011: 162–165.)

Sulfonamidit ovat ensimmäisiä tehokkaita ja vaarattomia mikrobilääkkeitä, joita kehitettiin bakteria-infektioihin. Sulfonamidit toimivat kilpailevasti estäen bakteerien luonnollis-

ta substraattia PABA:a (para-aminobentsoehappo) toimimasta ja näin ollen sulfonamidit estävät bakteerin foolihapposynteesiä. Foolihapposynteesin häiriinnyttyä syntyy bakteerissa ketjureaktio, jonka lopullinen tehtävä on estää bakteerin proteiinisynteesi. Trimetopriimit ovat synteettisiä mikrobilääkkeitä, jotka otettiin käyttöön 1960-luvun loppupuolella. Trimetopriimit vaikuttavat samaan reaktiosarjaan kuin sulfonamiditkin, mutta eri kohtaan. Trimetopriimit vaikuttavat PABA:n sijasta reaktiosarjan foolihapporeduktaasikohtaan, mutta lopputulos on sama eli proteiinisynteesin estäminen. Sulfonamidit kuin myös trimetopriimit luetaan kuuluvaksi bakteriostaattisiin mikrobilääkkeisiin. Niillä on toisiaan voimistava vaikutus, niin sanottu synergistinen vaikutus, ja näin ollen sulfonamideja ja trimetopriimeja käytetään hoidoissa monesti yhdessä. (Järvinen ym. 2011: 170–172.) Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorin herkkyyskorteissa on käytössä sulfa-trimetopriimiyhdistelmä.

Streptogramiini-ryhmän mikrobilääkkeet vaikuttavat bakteerien ribosomeihin ja sitä kautta estävät proteiinisynteesiä. Esimerkkeinä tämän ryhmän antibiooteista ovat kinupristiini ja dalfopristiini. (Järvinen ym. 2011: 185.) Streptogramiinit ovat uudempia mikrobilääkkeitä ja ne on varta vasten suunniteltu grampositiivisten bakteeri-infektioiden hoitoon (Wecker ym. 2010: 543).

Linetsolidi kuuluu uusiin mikrobilääkkeisiin, jotka luetaan oksatsolidinoni-nimiseen ryhmään. Linetsolidi sitoutuu bakteerien ribosomeihin 50S-alayksikköön ja tästä johtuen bakteerien proteiinisynteesi estyy. Linetsolidi on tehokas etenkin grampositiivisia bakteereita kohtaan, mukaan lukien myös monet vankomysiinille resistentit enterokokit ja metisilliinille resistentit stafylokokit. Linetsolidin käyttöä on rajoitettu vaikeiden infektioiden hoitoon, lähinnä monien resistenttien kantojen muun muassa MRSA:n aiheuttamien infektioiden hoitoon. (Järvinen ym. 2011: 185.)

Fusidiinihappo on tehokas lääke stafylokokkien aiheuttamien infektioiden hoidossa. Fusidiinihappo vaikuttaa bakteerien proteiinisynteesiin. Pääasiallisesti fusidiinihappoa käytetään vain paikallishoidossa esimerkiksi silmätippoina. Vaikka tästä lääkkeestä onkin tehty myös parenteraalinen muoto, on sen käyttöä rajoittanut nopea stafylokokkien resistenttisyys. (Järvinen ym. 2011: 183.)

Virtsatieinfektioiden hoitoon tarkoitetut nitrofurantoiini ja fosfomysiini pystytään antamaan potilaalle suun kautta hyvän imeytymisensä johdosta ja lisäksi nämä lääkkeet erittyvät aktiivisessa muodossaan munuaisten kautta virtsaan. Nitrofurantoiini sekä



fosfomysiini ovat molemmat bakterisidisia lääkkeitä, etenkin jos virtsa on hapanta. Molemmille lääkkeille herkkiä bakteereita ovat monet tutut virtsatieinfektioiden aiheuttajat kuten enterokokit, *Escherichia coli* sekä stafylokokit. (Järvinen ym. 2011: 173–175.)

Kloramfenikoli lasketaan bakteriostaattisiin mikrobilääkkeisiin. Toksisuutensa vuoksi kyseistä lääkettä käytetään Suomessa enää vain paikallisesti, mutta halvan hintansa vuoksi monet kehitysmaat käyttävät sitä vielä monien infektioiden hoidossa. Paikallishoidossa monet grampositiiviset bakteerit ovat melko herkkiä kloramfenikolille. Kloramfenikoli kiinnittyy bakteerin ribosomin 50S-alayksikköön estäen bakteerien proteiini-synteesin. (Järvinen ym. 2011: 184–185.) Bakteerin kehittämä resistenssimekanismi kloramfenikolia vastaan on kloramfenikolin asetyylitransferaasin inaktivointi (Smith 2004: 228).

Mupirosiini sitoutuu bakteerin isoleusyyli-tRNA-syntetaasiin estäen sitä. Mupirosiinilla on siis isoleusiinia muistuttava osa rakenteessaan, joka mahdollistaa edellä mainitun toiminnan. Tärkeimmät bakteerit joihin mupirosiini tehoaa, ovat hemolyttiset streptokokit ja stafylokokit. Lisäksi moniresistentit MRSA-kannat ovat mupirosiinille herkkiä. Valitettavasti mupirosiini hajoaa nopeasti elimistössä ja näin ollen se soveltuu lähinnä vain paikallishoitoon. (Järvinen ym. 2011: 186–187.) Mupirosiinia käytetään myös voiteen muodossa MRSA-nenäkantajuuden häätöhoidossa (Puohiniemi 2012).

### 3.3 Nukleiinihapposynteesiin vaikuttavat antibiootit

Fluorokinolonit ovat nalidiksiinihappo-nimisestä lääkkeestä syntetisoituja aineita. Tämän ryhmän lääkkeet ovat DNA-gyraasin estäjiä. Pääasiallisesti fluorokinolonit ovat bakterisidisia lääkkeitä kasvaville soluille, mutta eivät niinkään soluille, joiden RNA-synteesi on jostain syystä pysähtynyt. Tämän ryhmän mikrobilääkkeistä antibioottikor-teissamme esiintyvät levofloksasiini, ofloksasiini, moksifloksasiini ja siprofloksasiini. Ryhmän lääkkeet tehoavat gramnegatiivisista bakteereista hemofiluksiin, neisserioihin ja enterobakteereihin. Grampositiiviset bakteerit ovat resistentimpiä, mutta osa fluoro-kinoloneista tehoaa kohtalaisesti muun muassa *Staphylococcus aureukseen*. Moksifloksasiini on muita tämän ryhmän mikrobilääkkeitä tehokkaampi grampositiivisia bakteereita kohtaan. (Järvinen ym. 2011: 165–170.)

Rifampisiini luetaan kuuluvaksi bakterisidisiin mikrobilääkkeisiin. Se vaikuttaa bakteerin RNA-synteesiin. (Järvinen ym. 2011: 183–184.) Rifampisiini on lähtöisin rifamysiini B

-nimisestä lääkkeestä, jota tuotetaan *Streptomyces mediterranein* -sienellä. Tärkein rifampisiinin kyky on sen teho *Mycobacterium tuberculosis* sekä muihin mykobakteereihin. (Coxon 2011: 470.) Tästä syystä rifampisiini voidaan lukea myös mykobakteerilääkkeisiin. Rifampisiini tehoaa myös streptokokkeihin, hemofiluksiin ja stafylokokkeihin. Valitettavasti bakteerit kehittävät herkästi resistenssiä rifampisiinille potilaan hoidon aikana, mikä onkin vaikuttanut sen käytön vähenemiseen. (Järvinen ym. 2011: 183–184.)

### 3.4 Antibioottiresistenssi

Bakteerit ovat olleet maapallolla miljardeja vuosia ennen ihmistä. Niiden sopeutuminen ympäristön olosuhteisiin ja niiden muutoksiin on erinomaista. Joillakin bakteereilla on myös DNA-vaurioiden korjausmekanismi, joka auttaa niitä selviytymään esimerkiksi säteilyn aiheuttamilta vaurioilta. Geenien muuntelukyky on myös auttanut bakteereita kehittämään itselleen resistenssigeenejä. Bakteeri voi olla samanaikaisesti resistentti usealle mikrobilääkkeelle, jolloin voidaan puhua moniresistenttisyydestä. (Huovinen 2009.)

Ensimmäinen mikrobilääkevalmiste Prontosil® (sulfonamidi) otettiin käyttöön vuonna 1935, mutta kiusallisten sivuvaikutustensa takia se jäi nopeasti penisilliinin varjoon. Mikrobilääkkeet nostivat merkittävästi ihmisen eliniän odotetta. Lääkkeiden kehittäminen lähti varsinaisesti liikkeelle vasta toisen maailmansodan jälkeen, mutta pysähtyi kuitenkin 1980-luvulla tehokkaiden antibioottien tultua markkinoille sekä uusien lääkeyhdistysten vaikean löytämisen takia. (Huovinen 2009; Järvinen ym. 2011: 112–113.)

Luonnollinen resistenssi on bakteerille tyypillinen ominaisuus. Se vaihtelee suuresti eri bakteerilääkkeitä kohtaan, joka puolestaan vaikuttaa merkittävästi lääkkeen valintaan. (Järvinen ym. 2011: 122.) Suomalainen mikrobilääkeresistenssin tutkimusryhmä FiRe on koonnut aerobisesti kasvavista bakteereista tiedot luonnollisesta resistenssistä. Opinnäytetyössämme käytetyissä bakteereissa luontaista resistenssiä esiintyy esimerkiksi streptokokeilla fluorokinoloneja kohtaan ja enterokokeilla muun muassa kefalosporiineja, karbapeneemejä sekä makrolideja kohtaan. (Bakteerien luonnollinen lääkeresistenssi 2009.)

Bakteerien hankittu resistenssi voi aiheutua bakteerin kromosomissa tapahtuvasta mutaatiosta tai ulkoisen tekijän vaikutuksesta. Resistenssi voi kehittyä lääkehoidon aika-

na, jos esimerkiksi lääkeaineen konsentraatio ei saavuta tarvittavaa pitoisuutta kohde-  
kudoksessa. Resistenssin ehkäisemiseksi bakteerilääkkeen annostus tulisi olla tarvitta-  
van suuri, jotta koko bakteeripopulaatio kuolisi. Resistenssigeeni voi levitä bakteerista  
toiseen myös plasmidivälitteisesti. Grampositiivisilla bakteereilla tämä tapahtuu trans-  
duktion välityksellä. (Järvinen ym. 2011: 128.) Transduktiossa bakteriofagi voi siirtää  
plasmidin sisältämän geneettisen materiaalin bakteerista toiseen (Männistö – Tuomi-  
nen 2007: 792). Gramnegatiiviset bakteerit puolestaan voivat siirtää kokonaisen plas-  
midin toiseen soluun konjugaation avulla (Järvinen ym. 2011: 128). Bakteerin kehittä-  
miä mekanismeja lääkeresistenssille ovat muun muassa kyky inaktivoida lääke, muut-  
taa lääkkeen vaikutuskohdetta, vähentää solujen sisäänottokykyä sekä toisinpäin, eli  
lisätä lääkkeen ulosvirtausta. (Smith 2004: 221.)

Antibioottiresistenssin kehittymisellä on merkittävä rooli potilaan parantumisessa. Re-  
sistentit mikrobit lisäävät kuolleisuutta, pitkittävät hoitoaikoja sekä lisäävät kustannuk-  
sia. Hautala ja Lumio pohtivat artikkelissaan ”Antibioottien käyttö sairaalassa – ohjata  
vai rajoittaa” (Duodecim 15/2005) mahdollisia keinoja estää mikrobilääkeresistenssin  
lisääntymistä. Mikrobilääkeresistenssin taltuttamiseksi on laadittu kansainvälisiä toimin-  
taohjeita, mutta toteutuksen vaikeudet tulevat ilmi hoitokäytäntöjen eroavaisuuksissa  
sekä tutkimustulosten soveltumattomuudesta suomalaiseen sairaalamaailmaan. Bak-  
teerien resistenssistä ei todennäköisesti päästä koskaan eroon. Resistenssiä voidaan  
yrittää torjua vähentämällä mikrobilääkkeiden käyttöä sekä estää bakteerien leviämi-  
nen. Uusia lääkkeitä kehitetään koko ajan, mutta niiden kehityskaari on pitkä, jopa  
kymmenen vuotta. (Huovinen 2009.)

Bakteerien lääkeresistenssiä seurataan kansainvälisesti. Suomessa mikrobilääkeresis-  
tenssiä tutkii FiRe-tutkimusryhmä, joka perustettiin vuonna 1992. Tutkimusryhmä koos-  
tuu 25 suomalaisesta kliinisen mikrobiologian laboratoriosta sekä Terveiden ja hyvin-  
voinninlaitoksen bakteriologian yksiköstä. Vuonna 1996 valmistunut ensimmäinen Fi-  
Re-standardi on otettu käyttöön lähes kaikissa Suomen mikrobiologian laboratorioissa.  
Standardi perustuu CLSI:n (Yhdysvaltalainen Clinical and Laboratory Standards Institu-  
te) asettamaan standardiin. FiRe siirtyi vuonna 2009 Euroopan laajuiseen mikrobilää-  
keresistenssiä tutkivaan EUCAST-toimikuntaan. (FiRe 2011.) EUCAST-toimikunta on  
yhdenmukaistanut Euroopan maiden antibioottiherkkyyksien raja-arvot. Uusien raja-  
arvojen määrittämisprosessissa on otettava huomioon lääkkeen annostus, farmako-  
kinetiikka, mahdolliset resistenssimekanismit, MIC-arvot, kiekkomenetelmän halkaisija-  
alue, farmakodynamiikka sekä epidemiologiset raja-arvot. (EUCAST 2012.)

## 4 Vitek®2-analysaattori

Vitek®2-analysaattori (kuvio 1) on automatisoitu menetelmä bakteeri- ja hiivalajien tunnistukseen sekä antibioottiherkkyiden määrittämiseen. Vitek®2-analysaattorin bakteerien tunnistusmekanismit perustuvat API®:en tapaan biokemiallisiin reaktioihin, jotka syntyvät eri bakteeri- ja hiivasienilajien reagoidessa korteissa olevien substraattien kanssa. Antibioottiherkkyudet mitataan transmittanssin avulla. (Pincus 2007: 1-2.)



Kuvio 1. Vitek®2-analysaattori.

### 4.1 Bakterilajien tunnistus

Bakteerien tunnistamiseen käytettävät reagenssikortit sisältävät 64 kaivoa, jotka sisältävät kuivatun substraatin jokaisen parametrin määrittämiseen. Kaivoissa tapahtuvat kemialliset värimuutokset johtuvat esimerkiksi happamuuden muutoksista, entsyymien hydrolyysistä sekä bakteerin kasvusta inhibiittorin läsnä ollessa. Kaivoja ympäröi optisesti kirkas kalvo, joka mahdollistaa hyvän hapen vaihtuvuuden samalla kuitenkin estäen eri kaivojen materiaalien sekoittumisen keskenään. Bakterisuspensio imaistaan kortteihin siirtoputken avulla alipaineistetussa kammiossa. Alipainekammiossa suspensio siirtyy myös tasaisesti jokaisen osion omaan mikroputkeen ja sitä kautta kuhunkin kaivoon. Tämän jälkeen siirtoputki katkaistaan ja kortti suljetaan, jolloin se on valmis inkubaatiovaiheeseen. Vitek®2-analysaattori käyttää jokaista analysikorttia 15 minuutin välein optisella laitteistolla, jossa jokaisen kammion reaktiot luetaan. Optinen systeemi ilmaisee testireaktiot näkyvän valon aallonpituuksina. Kammioiden erilaiset substraattien metaboliat näkyvät joko värireaktioina tai samentuman muutoksina. Vitek®2-

analysaattorin järjestelmässä on erityinen algoritmi, jolla pystytään sulkemaan pois esimerkiksi pienistä ilmakuplista johtuvat väärät lukemat. (Pincus 2007: 2-6.)

Analysaattori vertaa tunnistuksessaan saamia mittaustuloksia valmistajan tietokantaan ja antaa todennäköisimmän nimen mikro-organismille. Valmistajan tietokanta koostuu erilaisista hyvin tunnettujen mikro-organismien kantakokoelmista, joita on saatu muun muassa kliinisistä ja teollisista lähteistä sekä julkisista että yliopistojen kokoelmista. Testireaktiot ilmaistaan "+", "-" ja heikot reaktiot (+) ja (-). Tunnistustasosta analysaattori antaa myös kommentin: Excellent (96–99%), very good (93–95%), good (89–92%) ja acceptable (85–88%). Low Discrimination -tapauksessa analysaattori ilmoittaa kahden tai kolmen todennäköisimmän mikrobin nimen. Muiden vaihtoehtojen poissulkeminen tapahtuu vaihtoehtoisilla tunnistusmenetelmillä. (Pincus 2007: 6-7.)

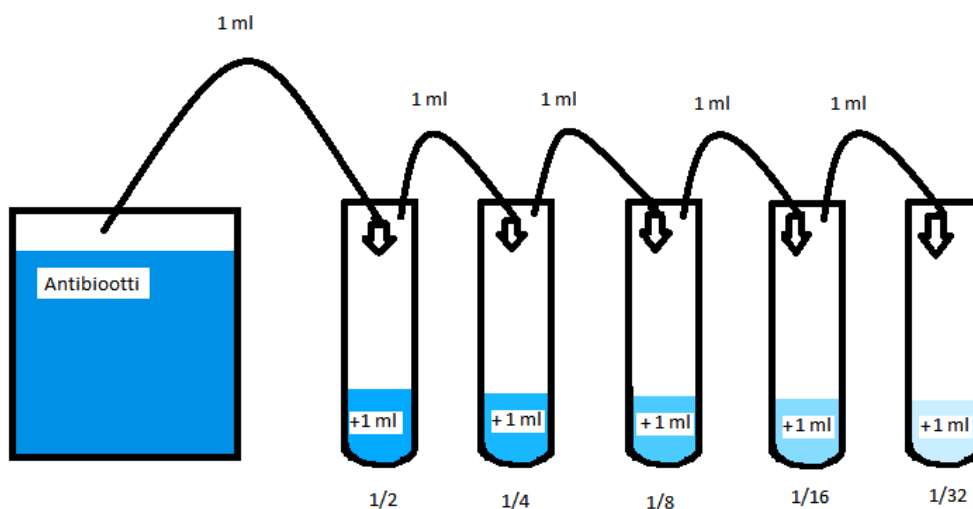
#### 4.2 Antibioottilherkkyyden määrittäminen

Antibioottilherkkyydestä tehdään useimmiten organismeille, joiden epäillään kuuluvan lajeihin, joilla on olemassa resistenssi yleisimmin käytetyille mikrobilääkkeille. Potilasnäytteestä eristetyt organismit, jotka voivat olla mahdollisia patogeenejä, valitaan kasvatusmaljalta ja puhdasviljellään. Puhdasviljelmästä valmistetaan bakteerisuspensio, jota käytetään antibioottilherkkyyssmäärittämiseen Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorilla. Herkkyysskortin tulokset tarkastellaan ja MIC arvo määritetään. Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorin antama MIC-arvo auttaa lääkäreitä määrittämään oikean mikrobilääkevahvuuden, joka vaaditaan mikrobiorganismien tuhoamiseen infektoituneella alueella. (BioMérieux 2008.)

MIC-arvo on perinteisesti määritetty käyttämällä antibioottilaimennussarjoja. Laimennussarjojen avulla MIC on tullut siitä, mikä on alhaisin konsentraatioarvo kyseiselle antibiootille, jossa bakteerin kasvu estyy. Tästä MIC-arvosta on sitten annettu SIR-järjestelmän mukaisesti tulkinta, mikä auttaa lääkäreitä pohtimaan hoidon suuntaa. (BioMérieux 2008.)

AST-kortit ovat Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorilla automatisoitu menetelmä, joka pohjautuu MacLowryn, Marshin ja Gerlachin ilmoittamaan MIC-menetelmään. AST-kortit ovat siis pienennetty ja lyhennetty versio niin kutsutusta Doubling dilution technique-menetelmästä. AST-korteissa olevissa 64 kaivossa on siis eri antibiootteja eri konsentraatioina. Kunkin antibiootin konsentraatiot puolittuvat aina seuraavan kaivon kohdalla. Eli jos ensimmäisessä kaivossa antibiootin konsentraatio on X, niin seuraavassa sen

konsentraatio on  $X/2$ , kolmannessa kaivossa on jo  $X/4$  ja niin edelleen. (BioMérieux 2008.) Kuviossa 2 on havainnollistettu edellä mainittu Doubling dilution technique -titrausmenetelmän periaate.



Kuvio 2. Doubling dilution technique.

Vitek®2-analysaattori valmistaa bakteerintunnistusta varten tehdystä bakteerisuspensiosta standardoidun vahvuisen uuden suspension antibioottilherkkyttä varten. Analysaattori ottaa siis jonkin verran bakteerisuspensiota ja sekoittaa sen 0,45 % suolaliuokseen. Valmistaa uutta suspensiota imetään antibioottilherkkyyskorttiin kortilla olevalla pillillä. Suspensio levittyy tasaisesti kuhunkin kaivoon kortilla olevia mikroputkia pitkin. Tämän jälkeen pilli katkaistaan, kortti suljetaan ja siirretään inkubaatiokaruselliin. Analysaattori seuraa kussakin kaivossa tapahtuvaa bakteerin kasvua tietyin väliajoin maksimissaan 18 tuntiin asti. (BioMérieux 2008.)

Vitek®2-analysaattori arvioi kunkin organismin kasvua antibiootin läsnä ollessa verraten kutakin kaivoa kontrollikaivoon, jossa organismi kasvaa vapaasti. Analysaattorissa on useita kasvua tarkkailevia parametreja, joiden antama tieto antaa tarkoituksenmukaista tietoa MIC-arvojen laskemiseen. Tulosten tulkinnassa käytetään myös erotteluanalyysia, jolla Vitek®2-analysaattori muodostaa algoritmin, mikä määrittää antibioottilherkkyystuloksen kullekin mikrobilääkkeelle. MIC-arvo tulee olla linkitettyä organismin tunnistukseen, jotta saadaan tulkittua oikea luokka. (BioMérieux 2008.)

Tilanteissa, joissa organismin tunnistaminen on epävarmaa, on tarpeellista tehdä varmistustesti, jotta organismi saadaan tunnistettua ja näin ollen luokiteltua oikein sekä tehtyä luotettava antibioottil herkkyysmääritys. Antibioottien kohdalle Vitek®2-analysaattori antaa resistentti-tilanteissa kortissa tulokseksi ”+” ja jos organismi onkin antibiootille herkkä, tulee tällöin arvoksi ”-”. Vitek®2-analysaattorin antama lopullinen tulkinta näytteen lääkeherkkyydelle on SIR-järjestelmän mukainen S, I tai R. (BioMérieux 2008.)

#### 4.3 Aikaisemmat tutkimukset

Löysimme useita erilaisia Vitek®2-analysaattorista tehtyjä tutkimuksia etsiessämme taustatietoja. Monet tutkimukset käsittelivät kuitenkin gramnegatiivisia bakteereita tai pelkästään lajien tunnistusta, joten pystyimme rajaamaan kyseiset tutkimukset heti työmme ulkopuolelle. Ahkeran etsinnän tuloksena löysimme kuitenkin kolme omaan aihealueeseemme liittyvää Vitek®2-tutkimusta.

Italiassa Veronan yliopiston mikrobiologian osasto teki vuonna 2002 tutkimuksen ”Evaluation of the VITEK 2 System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Medically Relevant Gram-Positive Cocci”. Tutkimus julkaistiin arvostetussa Journal of Clinical Microbiology -lehdessä. Kyseisessä tutkimuksessa arvioitiin uuden Vitek®2-analysaattorin kykyä tunnistaa ja tehdä antibioottil herkkyysmääritykset gramposiitiivisille kokkibakteereille. Lisäksi tutkimuksessa tarkkailtiin analyysiaikoja, joita Vitek®2-analysaattori käytti bakteerin tunnistamiseen ja herkkyuden määrittämiseen. (Ligozzi ym. 2002: 1681)

Bakteerien tunnistamisen vertailukeinoina tutkimuksessa käytettiin API Staph -menetelmää stafylokokeille ja API 20 Strep -menetelmää streptokokeille sekä enterokokeille. Antibioottil herkkyysien vertailukeinona käytettiin NCCLS:n (nykyisin CLSI) mukaista agarlaimennos-menetelmää. Vitek®2-analysaattorilla bakteerien tunnistamiseen käytettiin grampositiivisten bakteereiden identifikaatiokorttia (ID-GPC). Antibioottil herkkyysmääritykseen Vitek®2-analysaattorilla käytettiin kolmea erilaista antibioottil herkkyyskorttia riippuen analysoitavasta bakteerista. Pneumokokeille käytettiin AST-P506-korttia, stafylokokeille AST-P515-korttia ja enterokokeille sekä *Streptococcus agalactiae*lle käytettiin AST-P516-korttia. Tutkimuksessa oli mukana yhteensä 384 grampositiivista bakteerilajia. Bakteerilajien jaottelu oli seuraavanlainen: koagulaasinegatiiviset stafylokokit (n=100), *Staphylococcus aureus* (n=100), *Streptococcus*

*agalactiae* (n=29), *Enterococcus spp.* (n=89) ja *Streptococcus pneumoniae* (n=66). (Ligozzi ym. 2002: 1681.)

Vitek®2-analysaattori tunnisti oikein 99 % *Staphylococcus aureus*, 96,5 % *Streptococcus agalactiae*, 96,9 % *Streptococcus pneumoniae*, 92,7 % *Enterococcus faecalis*, 91,3 % *Staphylococcus haemolyticus*, 88 % *Staphylococcus epidermidis* ja 71,4 % *Enterococcus faecium* bakteereista. NCCLS:n antamien raja-arvojen perusteella Vitek®2-analysaattori antoi antibioottilherkkyysmäärittäyksissä 96 prosenttisesti vastaavan tuloksen vertailumenetelmien tuloksiin. Kaiken kaikkiaan antibioottilherkkyysien määrittämisessä esiintyi 0,82 % (n=7) very major error-, 0,17 % (n=3) major error- ja 2,7 % (n=67) minor error -virheitä. Tutkimuksen johtopäätös oli se, että Vitek®2-analysaattori on tarkka ja hyväksyttävä analysaattori tehtäessä grampositiivisten bakteerien tunnistusta ja niiden antibioottilherkkyysien määrittämistä. (Ligozzi ym. 2002: 1681.)

Yhteneväsyyksiä opinnäytetyömme ja Veronan tutkimuksen välillä oli muun muassa bakteereiden samanlaiset säilytysolosuhteet, samankaltainen elvyttäminen pakastamisen jälkeen, samoja grampositiivisia bakteerilajeja ja tietenkin myös sama analysaattori. Bakteerilajit olivat Veronan tutkimuksessa säilytetty pakastettuina soijaglyserolipohjaisessa sekoituksessa. Opinnäytetyössämme bakteerit olivat säilytetty pakastettuna maitoglyserolipohjaisessa sekoituksessa. Tutkimuksessa bakteerit elvytettiin pakastuksesta lampaanverimaljoille, joita kasvatettiin yön yli 35 °C lämmössä. Opinnäytetyössämme käytimme *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecium* -bakteerilajeja, jotka olivat myös käytössä Veronan tutkimuksessa. Vitek®2-analysaattorilla käytimme samaa grampositiivisten bakteereiden tunnistuskorttia (ID-GPC). Antibioottilherkkyysmäärittäyksissä käytössämme oli eri kortit kuin Veronan tutkimuksessa. Stafylokokkien antibioottilherkkyysissä käytimme AST-P580-korttia, *Streptococcus pneumoniae* -näytteissä AST-P576-korttia, streptokokeilla AST-ST01-korttia ja enterokokeilla AST-P586-korttia. (Ligozzi ym. 2002: 1681–1686.)

Iowan yliopistossa tehtiin tutkimus ”BD Phoenix and Vitek 2 Detection of *mecA*-Mediated Resistance in *Staphylococcus aureus* with Cefoxitin”. Tutkimus toteutettiin vuosien 2001–2008 välisenä aikana ja julkaistiin Journal of Clinical Microbiology -lehdessä vuonna 2009. Tutkimuksen tarkoituksena oli verrata BD Phoenix ja Vitek®2 -analysaattoreiden kykyä sekä tarkkuutta tunnistaa *mecA*-välitteistä resistenssiä *Staphylococcus aureus* -kannoissa kefoksitiinin avulla. Tutkimuksessa otettiin siis käyt-



töön kefoksitiini-seulonta (OXS). Kefoksitiini-seulonnassa kefoksitiini sekä oksasilliini toimivat yhteistyössä määrittäessään lopullista tulkintaa resistenssille. (Junkins ym. 2009: 2879.)

Tutkimuksessa analysoitiin yhteensä 620 kliinisesti merkittävää *Staphylococcus aureus* -näytettä, joita kerättiin vuosina 2001–2007. Vitek®2-analysaattorilla antibioottilherkkyysmäärittämisessä käytössä oli AST-GP66 kortti. Analysaattoreiden oksasilliini- sekä kefoksitiinituloksia verrattiin referenssimenetelmiin, joita olivat *mecA*-geenin löytäminen PCR-menetelmällä ja oksasilliinin MIC-arvot, jotka oli aiemmin määritetty CLSI:n BMD (Broth Microdilution Method) -standardin mukaisesti. (Junkins ym. 2009: 2879 – 2880.)

Tuloksista kävi ilmi, että kefoksitiinin ja oksasilliinin yhteistyö analysoinnissa nosti molempien analysaattoreiden kykyä tunnistaa MRSA. Vitek®2-analysaattorin kohdalla herkkyys tunnistaa MRSA nousi 98,2 prosentista 99,8 prosenttiin, kun antibioottilherkkyysmäärittämiseen otettiin kefoksitiini mukaan. Molempien analysaattoreiden kohdalla esiintyi yksi very major error -virhe. Vitek®2-analysaattorilla kyseessä oli oksasilliini resistentti kanta. Vitek®2-analysaattorin virhe tuli eri kannasta kuin BD Phoenixin tunnistama. Vitek®2-analysaattorilla esiintyi myös 0,6 % verran major error -virheitä, mutta saadut virheet olivat vielä hyväksyttävissä rajoissa. (Junkins ym. 2009: 2880 – 2882.)

Otimme tämän tutkimuksen mukaan teoriaamme sen takia, että opinnäytetyössämme oli mukana kymmenen MRSA-näytettä. Näissä kannoissa Vitek®2-analysaattori käytti tulosten analysoinnissa mukana kefoksitiini-seulontaa. Tutkimus antoi myös osviittaa Vitek®2-analysaattorin kyvylle tunnistaa MRSA:n antaen niille oikeanlaisen antibioottilherkkyyden.

Espanjassa Hospital General Universitarion mikrobiologian osastolla tehtiin vuonna 2000 tutkimus ”Evaluation of a New System, VITEK 2, for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Enterococci”. Tutkimuksen tarkoituksena oli arvioida Vitek®2-analysaattorin kykyä tunnistaa enterokokkeja ja samalla saada aikaan luotettava antibioottilherkkyys tunnistetuille bakteereille. (Garcia-Garrote – Cercenado – Bouza 2000: 2108.)

Bakteerien tunnistamisen vertailukeinoina tutkimuksessa käytettiin Facklamin ja Sahmin -järjestelmää sekä API 20 Strep -menetelmää. Antibioottilherkkyyden määrittämisessä vertailumenetelminä olivat BMD- ja agar-laimennosmenetelmät. *VanA*- ja *vanB*-

geenien läsnäolo bakteerilajeissa määritettiin PCR:llä. Vitek®2-analysaattorilla enterokokkien tunnistamiseen käytettiin grampositiivisten bakteereiden tunnistuskorttia (ID-GPC). Antibioottiherkkyyismäärittelyyn enterokokeille tutkimuksessa käytettiin AST-P516 antibioottiherkkyysskorttia. (Garcia-Garrote ym. 2000: 2108–2109.)

Tutkimuksessa oli käytössä yhteensä 150 enterokokkilajia. Näistä 150 lajista 125 olivat tutkimuksen suorittaneen laboratorion omia kymmenen vuoden ajalta keräämiä näytteitä. Loput 25 enterokokkilajia lähetettiin muista Espanjan instituutioista. Bakteerilajien jaottelu oli seuraavanlainen: *Enterococcus faecalis* (n=60), *Enterococcus faecium* (n=55), *Enterococcus gallinarum* (n=26), *Enterococcus avium* (n=5), *Enterococcus durans* (n=2) ja *Enterococcus raffinosus* (n=2). Suurin osa tutkimuksessa käytetyistä enterokokkilajeista oli valittu niiden tietynlaisen resistenssin vuoksi. Vankomysiinille resistenttejä lajeista oli 66 % (57 *vanA*, 16 *vanB* ja 26 *vanC*), ampisilliinille resistenttejä oli 23 %. 31 % oli korkean tason gentamysiiniresistenttejä (HLGR eli high-level gentamicin resistance) ja 45 % oli korkean tason streptomysiiniresistenttejä lajeja (HLSR eli high-level streptomycin resistance). (Garcia-Garrote ym. 2000: 2108.)

Vitek®2-analysaattori tunnisti 150 enterokokkinäytteestä 131 lajia oikein. Vitek®2-analysaattori tunnisti siis väärin 19 lajia, joista noin puolet oli *Enterococcus faecium*-lajia, joilla oli lievä resistenssi vankomysiinille. Vitek®2-analysaattori tunnisti kuitenkin nämä näytteet joko *Enterococcus gallinarum*- tai *Enterococcus casseliflavus*-lajiksi, josta virheet johtuivat. Yksinkertaisella motiliteettitestillä eli bakteerin liikkuvuustestillä saatiin vähennettyjä näitä virheitä. Antibioottiherkkyydessä prosentuaaliset yhteneväisyydet eri antibioottien kohdalla olivat seuraavanlaiset: ampisilliini 93 %, vankomysiini 95 %, teikoplaniini 97 %, gentamysiini korkea taso 97 % ja streptomysiini korkea taso 96 %. Vankomysiinin kohdalla Vitek®2-analysaattori tunnisti 99 vankomysiiniresistentistä kannasta 93 lajia. Näistä 93 lajista Vitek®2-analysaattori tunnisti prosentuaalisesti 96 % *vanA*-, 81 % *vanB*- ja 96 % *vanC*-lajeiksi. (Garcia-Garrote ym. 2000: 2109–2110.)

Vankomysiinin kohdalla esiintyi very major error -virhettä 4 %:n verran. Ampisilliinin, teikoplaniinin ja gentamysiinin korkean tason kohdalla very major error -taso oli 1,3 %. Vitek®2-analysaattori merkitsi yhdeksän ampisilliinille herkkää *Enterococcus faecalis*-lajia resistenteiksi. Vitek®2-analysaattori ei myöskään tunnistanut 13 beetalaktaamasipositiivista *Enterococcus faecalis*- ja kolmea ampisilliini resistenttiä beetalaktaamasinegatiivista *Enterococcus faecalis*-lajia resistenteiksi. Lisäksi Vitek®2-analysaattori luokitteli kaksi HLGR-lajia väärin. (Garcia-Garrote ym. 2000: 2109–2110.)

Tutkimuksen lopputuloksena oli se, että Vitek®2-analysaattori on helppokäyttöinen ja antaa nopeasti 4-15 tunnin sisällä kohtuullisen tarkasti tunnistuksen bakteerilajista. Lisäksi Vitek®2-analysaattori tunnistaa tarkasti bakteerilajin resistenssin ampicilliinille ja glykopeptideille sekä korkean tason gentamysiinille että streptomysiinille. Kuitenkin Vitek®2-analysaattori kaipaa hieman lisää kehitystä tarkkuuteensa tunnistaa bakteerilaji, tulosten tulkintaan ja tietokantaansa. Tärkein hyöty Vitek®2-analysaattorista on se, miten bakteerilajien käsittelyaikaa saadaan lyhennettyä huomattavasti ja näin ollen sillä on positiivinen vaikutus työnkulkuun mikrobiologian laboratoriossa. (Garcia-Garrote ym. 2000: 2110–2111.)

Valitsimme tämän tutkimuksen opinnäytetyöhömme siinä käsiteltujen bakteerilajien, antibioottilherkkyyسمäärityksen ja Vitek®2-analysaattorin vuoksi. Opinnäytetyössämme eniten suuria virheitä oli juuri *Enterococcus faecalis* ja *Enterococcus faecium* kohdalla. Espanjan tutkimuksessakin käy esille Vitek®2-analysaattorin rajoittunut kyky antaa täysin tarkkaa bakteerilajin tunnistusta sekä antibioottilherkyyttä. Enterokokkien kohdalla VRE-kannat tuovat Vitek®2-analysaattorille myös omat haasteensa. Espanjan tutkimuksessa olivatkin nämä erilaiset VRE-lajit runsaasti edustettuna. Opinnäytetyössämme käsitelimme kymmenen VRE-, kymmenen *Enterococcus faecalis*- sekä kymmenen *Enterococcus faecium* -lajia.

## 5 Toteutus

Opinnäytetyömme toteutettiin HUSLABin kliinisen mikrobiologian vastuualueen bakteriologian osastolla. Työssämme oli yhteensä 102 näytettä, joista kymmentä *Staphylococcus aureus* -näytettä käytimme esitutkimuksessa. Esitutkimuksen tarkoituksena oli opetella analysaattorin toiminta ja käyttö, sekä saada selville työmme kannalta mahdolliset virhelähteet ja niiden välttäminen. Otimme näiden esitutkimusnäytteiden tulokset mukaan lopulliseen tulosvertailuun.

Työmme varsinainen toteutus tapahtui 21.5–1.6.2012. Ensimmäisenä päivänä etsimme näytteet näytevaraston pakastimista, joissa näytteet ovat säilytyksessä (-70 °C) muoviampuilleissa maitoglyserolipohjaisessa seoksessa. Näytteet olivat pääosin bakteriologian osastolla tutkittuja potilasnäytteitä. Joukossa oli myös muutama laaduntarkkailunäyte. Elvytimme näytteet viljelemällä ne verimaljoille ja kasvatimme niitä hiilidioksidipitoisessa lämpökaapissa (+35 °C) yön yli. Seuraavana päivänä teimme puhtasviljelmät. Puhtasviljelmistä valmistettiin bakteerisuspensio analysaattoria varten ja näin ollen

vasta työn kolmantena päivänä saimme laitettua näytteet analysaattoriin. Vitek®2-analysaattori vaatii tuoreen näytteen, jonka takia jouduimme tekemään aina edellisenä päivänä puhdasviljelmät seuraavana päivänä analysoitavista näytteistä. Puhdasviljelmältä otimme viljelysauvalla tai vanupuikolla bakteerimassaa ja sekoitimme sen 0,45 % NaCl-liuokseen. Bakteerimassaa otettiin sen verran, että suspension vahvuus oli 0,50–0,63 McF. Vahvuus tarkistettiin BioMérieux:n DensiChek®-densitometrillä (kuvio 3). Pyrimme saamaan suspension vahvuudeksi 0,5 McF, mutta heikkokasvuisten bakteerien kohdalla tähtäsimme lähemmäs ylärajaa.



Kuvio 3. BioMérieux:n DensiChek®.

Suspension valmistamisen jälkeen asetimme näyteputket näytekasettiin. Näytekasetti sisältää muistikortin, jonka Smart Carrier -työasema (kuvio 4) lukee. Smart Carrier -työasemaan syötetään näytteen tiedot sekä käytettävien korttien viivakoodit. Jokaisesta näytteestä halusimme sekä bakteerin identifikaation (GPC-kortti) että herkkyysmäärittäksen (AST-kortti). Tämän johdosta suspensioputken viereen asetettiin tyhjä muovi-putki, johon analysaattori laimentaa itse herkkyysmäärittäksessä tarvittavan suspension käyttämällä identifikaatiota varten tehtyä bakteerisuspensiota. Näytteiden kirjaamisen jälkeen kasetti asetetaan Vitek®2-analysaattoriin.



Kuvio 4. Smart Carrier -työasema.

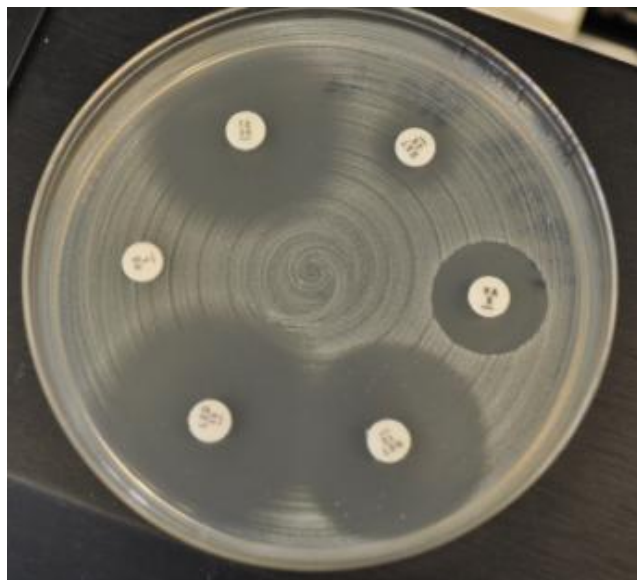
Työn suoritus sujui melko nopeasti, sillä saimme käyttööme laboratorion toisen Vitek®2-analysaattorin. Lisäksi saimme laittaa jonkin verran omia näytteitämme myös toiseen analysaattoriin päivittäisistä potilasnäytteistä vapautuviin paikkoihin. Analysaattori ottaa tarvittavan määrän bakteerisuspensiota määrittäksinsä, jonka jälkeen jäljelle jääneestä suspensiosta viljelimme perämaljat kontrolloimaan puhtautta. Seuraavana päivänä tarkistimme perämaljat, aloitimme tulosten käsittelyn sekä viljelimme uudet puhtasviljelmät seuraavan päivän näytesarjaa varten.

Vitek®2-analysaattorin ja aikaisemmin kiekkomenetelmällä saatujen tulosten erotessa toisistaan, teimme jatkotestaukset kiekkomenetelmällä tai Epsilon-testillä (E-testi), ja enterokokeille BEM- (Bile Esculin Media) ja arabinoosi-tunnistusmaljoilla. Bakteerilajien tunnistuksen varmistamiseksi käytimme myös *Staphylococcus aureus*-, MRSA- ja VRE-näytteissä kromogeenisia värimaljoja. *Streptococcus pneumoniae* -näytteissä asetimme puhtasviljelmiin optokiiniekot varmistaaksemme lajin oikeaksi. Työmme toteutusvaihe kesti kaksi viikkoa. Seuraavissa kappaleissa olemme esitelleet jatkotutkimusten menetelmien periaatteet.

Kromogeenisten värimaljojen toiminta perustuu elatusaineen sisältämiin substraatteihin ja väriyhdisteisiin, joita maljalla kasvava bakteeri hyödyntää pesäkkeiden muodostamisessa. Tietyn entsyymiaktiivisuuden omaava bakteeri tuottaa määrätyn värisiä pesäkkeitä reagoidessaan elatusaineen substraatin kanssa. (Meurman 2011: 108.) HUSLA-

Bissa käytössä olevalla SaSelect-maljalla *Staphylococcus aureus* kasvaa pinkkinä tai malvan punaisena pesäkkeenä. HUSLABissa vuonna 2009 tehdyn värimaljakokeilun mukaan SaSelect-maljan herkkyys oli 100 % eikä toistaiseksi ole löytynyt vääriä positiivisia tai vääriä negatiivisia tuloksia. (Kerttula 2009.)

Yleisimpänä herkkyysmenetelmänä käytettävä kiekkomenetelmä perustuu agardifuusioon. Maljan elatusaine valitaan bakteerilajin mukaisesti. Useimmiten maljan elatusaineena käytetään Mueller-Hinton agaria, mutta esimerkiksi streptokokkien herkkyysmäärittämisessä suositellaan käytettäväksi lampaan defibrinoitua verta kasvun mahdollistamiseksi. FiRe:n standardien mukaisesti tuoreesta bakteeriviljelmästä poimitaan muutama erillinen pesäke viljelysauvalla steriiliin 0,9 % keittosuolaliuokseen ja vahvuuden tulisi olla 0,5 McF. Suspensio dreijataan tasaiseksi matoksi elatusainemaljalle. Maljalle asetettavien antibioottien valinta riippuu bakteerilajista ja ne on asetettava riittävän kauaksi toisistaan. Antibioottikiekot on valmistettu suodatinpaperista, johon on imeytetty bakteerilääkeliuos. Maljaa tulee inkuboida 16–18 tuntia ja tulos on luettavissa kiekon ympärille muodostuvasta estorenkasta. (Nissinen 2009a.) Alla olevassa kuviossa on esimerkki kiekkomenetelmällä tehdystä antibioottiherkkyysmäärittäyksestä (kuvio 5).

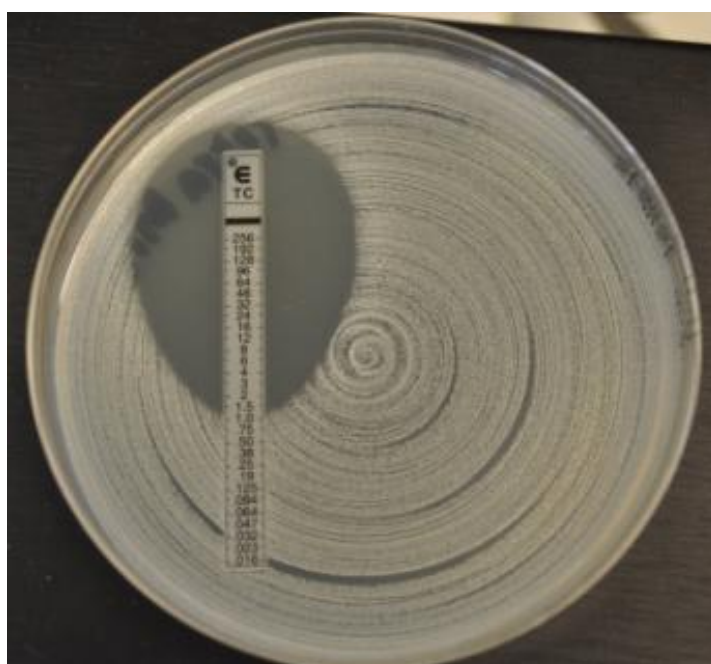


Kuvio 5. Kiekkomenetelmä Mueller-Hinton -maljalla.

Kiekkomenetelmällä antibioottikiekon ympärille muodostuvan estorenkain halkaisija mitataan ja millimetrlukemaa verrataan MIC-arvon luonnollisen logaritmin ja estorenkain halkaisijan väliseen lineaariseen riippuvuussuhteeseen perustuviin raja-arvoihin.

Raja-arvot vaihtelevat bakteerilajien mukaan. Raja-arvot määrittävät bakteerin lääkeherkkyyden joko resistentiksi (R, resistant) tai herkäksi (S, susceptible). Väliin jäävää noin 5mm leveää puskurivyöhykettä kutsutaan ”epävarmaksi” välialueeksi (I, intermediate). Resistentti tulos kertoo bakteerin sietokyvyn muuttuneen normaalia korkeammaksi, jolloin normaali lääkeannostus on luultavasti tehoton. Herkässä tuloksessa bakteerin lääkeherkkyys ei poikkea normaalista ja hoidossa voidaan käyttää normaalia lääkeannostusta. Puskurivyöhykkeelle jäävällä tuloksella bakteerin sietokyky on epävarma, ja sen tärkein tehtävä onkin ehkäistä menetelmän epätarkkuudesta johtuvat väärät R- tai S-tulkinnat. (Nissinen 2009a.)

E-testi on suoritukseltaan yksinkertainen menetelmä määrittää MIC-arvo kaupallisella liuskalla, johon on imeytetty nouseva lääkegradientti (kuvio 6). Tutkittavasta näytteestä valmistetaan bakteerisuspensio, joka levitetään tasaisesti elatusainemaljalle. Maljalle asetetaan liuska, jonka mitta-asteikosta MIC -arvo on helppo lukea kasvatuksen jälkeen. (Carlson – Koskela 2011: 44.)

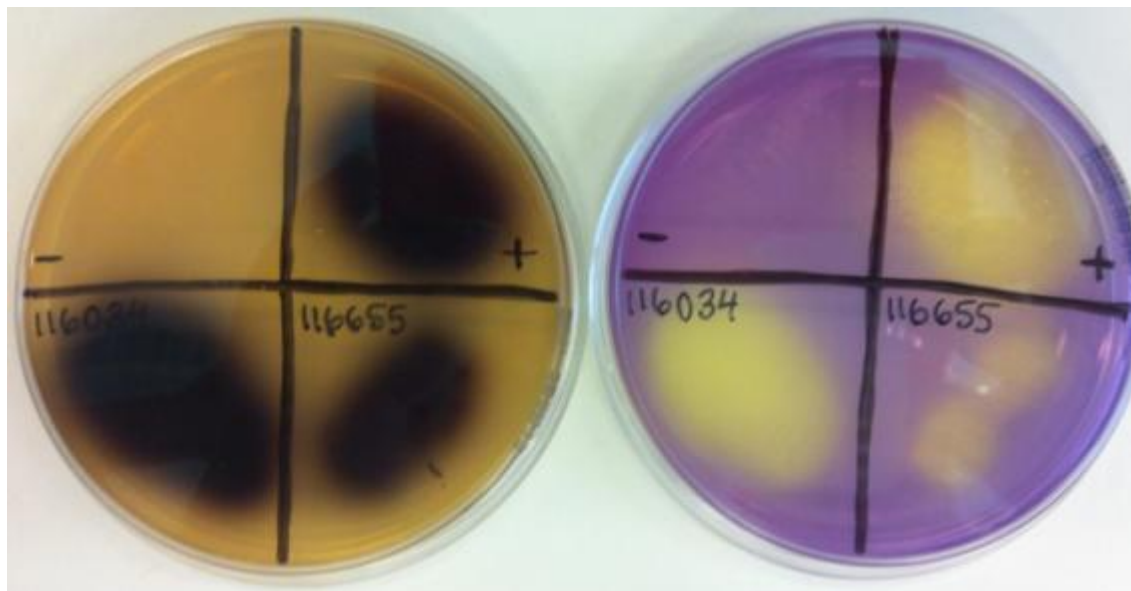


Kuvio 6. Epsilon-testi ja Mueller-Hinton -malja.

BEM- ja arabinoosimaljoja käytetään enterokokkien tunnistuksessa. Bakteerien fermentaatiolla eli käymisellä tarkoitetaan solussa tapahtuvaa hapetus-pelkistys reaktiosarjaa, jonka lopputuotteina syntyy yhdisteitä, jotka bakteeri erittää kasvualustansa.



(Salkinoja-Salonen 2002: 210.) Alla olevassa kuviossa (kuvio 7) esimerkkinä BEM- ja arabinoosimaljat, joissa näkyy ylälohkoissa kontrollinäytteiden reaktiot ja alalohkoissa kahden opinnäytetyössämme käytetyn näytteen reaktiot.



Kuvio 7. BEM- ja arabinoosimaljat.

BEM-maljalla voidaan erottaa enterokokit muista streptokokeista sappieskuliinitestillä. Maljalla kasvavat vain bakteerit, jotka pystyvät hydrolysoimaan eskuliinia saponin läsnä ollessa. Elatusaineeseen on lisätty inhibiittoreita, jotka estävät muiden grampositiivisten- ja gramnegatiivisten bakteereiden kasvun. Positiivinen reaktio näkyy maljalla mustana värimuutoksena, kun bakteerin tuottama metaboliatuote reagoi elatusaineen raudan kanssa. (Watson.)

Arabinoosimaljalla voidaan erottaa *Enterococcus faecium*- ja *Enterococcus faecalis*-lajit toisistaan. Arabinoosimaljan toiminta perustuu bakteerin kykyyn fermentoida arabinoosia ainoana hiilen lähteenään (Puohiniemi 2012). Maljan elatusaine sisältää muun muassa runsaasti arabinoosia sekä pH-indikaattorin. Jos bakteeri kykenee fermentoimaan arabinoosia, syntyy reaktiosta happamia yhdisteitä. Happamat tuotokset laskevat maljan pH:ta, jolloin indikaattori vaihtaa kasvavan bakteeripesäkkeen ympäriltä maljan värin violetista keltaiseksi. (BD Purple Agar Base.) *Enterococcus faecium* on arabinoosipositiivinen eli saa maljalla aikaan värimuutoksen.



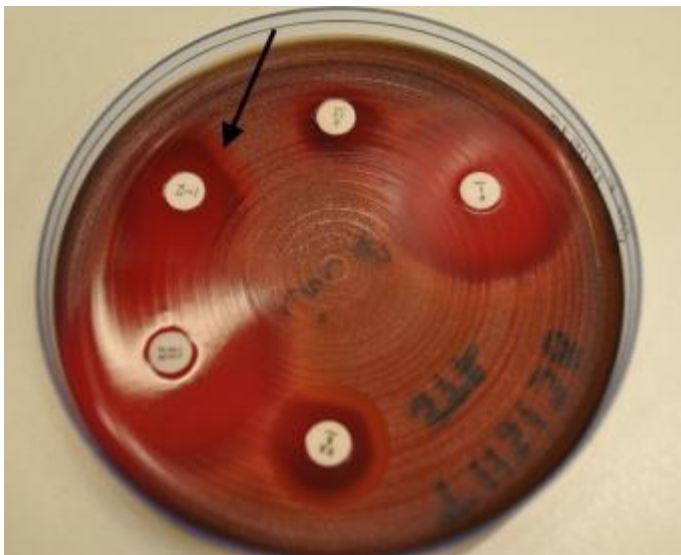
## 6 Tulokset

Vertasimme Vitek®2-analysaattorin antamia tuloksia aiemmin kiekkomenetelmällä tai E-testillä tutkittujen näytteiden tuloksiin, jotka oli syötetty bakteriologian osastolla käytössä olevaan Samba-järjestelmään. Ensisijaisena tulosvertailussa käytimme E-testin tulosta, mikäli näytteestä oli määritetty MIC-arvo. Käsittelimme tulokset ryhmissä herkkyyskorttien sekä bakteerilajien mukaan. Näytteet nimesimme tallennenumeroiden mukaan.

Poikkeamat luokiteltiin very major error, major error sekä minor error -ryhmiin vakavuutensa mukaisesti. Virheistä suurimmassa, very major error -tapauksissa, Vitek®2-analysaattori antaa herkkyystulokseksi herkän (susceptible), vaikka jatkotutkimuksissa kiekkomenetelmä ja E-testi varmistavat näytteen resistentiksi. Major error -virhe on päinvastainen, jolloin Vitek®2-analysaattori saa resistentin tuloksen, kun taas muut menetelmät osoittavat lajin olevan herkkä. Minor error -virheissä tulos on epävarma (intermediate) ja vertailussa käytettävällä menetelmällä joko herkkä tai resistentti.

Tulokset löytyvät taulukoituna liitteistä 2-5. Poikkeamat on merkitty värikoodeilla, joissa very major error -virhe on punaisella, major error oranssilla ja minor error -virheet keltaisella pohjalla. Tulkinnan edessä näkyvä \*-merkintä viittaa joko indusoituvaan klindamysiiniresistenssiin tai Vitek®2-analysaattorin itse vaihtamaan tulkintaan (AES-modified). Tähtimerkinnän syy on avattu tässä kappaleessa kyseisten näytteiden kohdalla. Taulukoissa näytteiden nimen kohdalla olemme myös maininneet Vitek®2-analysaattorin antaman lajin nimen sekä tunnistuksen ID-prosentin. Taulukossa oleva viiva tuloksen kohdalla viittaa siihen, ettei antibioottil herkkyysmäärittelyn tulosta ole saatu jommalla kummalla menetelmällä, eikä näin ole mukana tulosvertailussa.

Streptokokeilla ja stafylokokeilla esiintyy indusoituvaa klindamysiiniresistenssiä. Tämä resistenssi tulee esiin kiekkomenetelmällä erytromysiiniresistenssinä klindamysiiniestorenkaan jäädessä suureksi. Kun kiekkomenetelmässä asetetaan erytromysiini- ja klindamysiinikiekot vierekkäisille paikoille agar-maljalla, ilmenee resistenssi tällöin klindamysiiniestorenkaan litistymisenä erytromysiinikiekon puolella. Erytromysiini siis toimii resistenssin induktorina, mikä saa aikaan seinämän muodostumisen. Kuviossa 8 näkyy tämä ilmiö kiekkomenetelmällä. Tällaisessa tilanteessa kyseinen kanta tulee klindamysiiniestorenkaan halkaisijasta riippumatta tulkita resistentiksi klindamysiinille. (Nissinen 2009b.)



Kuvio 8. Indusoituva klindamysiiniresistenssi verimaljalla. Induktio näkyy klindamysiinikiekon estorenkään suorana seinämänä.

Vitek®2-analysaattorilla yllä esitetty resistenssi tulee esille indusoituvassa klindamysiiniresistenssi-testissä (ICR). Positiivinen ICR-tulos viittaa indusoivaan klindamysiiniresistenssiin, mikä vahvistaa tutkittavan bakteerin resistenssin makrolideille, linkosamideille ja streptogramiini B:lle. Jos tutkittavalle bakteerille tulee positiivinen ICR-tulos, tulee tulkinnassa tällöin ilmoittaa bakteeri resistentiksi klindamysiinille. Kuitenkin klindamysiini voi silti olla toimiva antibiootti kyseiseen bakteeriin joillakin potilailla. Jos ICR-testi on positiivinen tutkittaessa stafylokokkeja tai streptokokkeja ja klindamysiini saa arvon S tai I, Vitek®2-analysaattori vaihtaa tällöin SIR-tulkinnan pakotetusti R:ksi. (BioMérieux 2008.)

## 6.1 Stafylokokkikortti AST-P580

*Staphylococcus aureus* -näytteiden kohdalla kiekkomenetelmällä saatujen aikaisempien tuloksien ja Vitek®2-analysaattorin välillä ei ollut eroavaisuuksia. Näiden kymmenen näytteen kohdalla voimme todeta Vitek®2-analysaattorin toimivan lähes moitteettomasti. Näiden näytteiden kohdalla esiintyi aluksi muutamia virheitä, mutta ne saatiin pois suljettua tarkistusvaiheessa. Tarkistusvaiheessa näille näytteille tehtiin antibioottil herkkyysmääritys kiekkomenetelmällä sekä tarvittaessa E-testillä. Identifikaatioprosentti oli pääasiallisesti 99 % ja vain yhden näytteen kohdalla 93 %. Suurin osa käyttämistämme *Staphylococcus aureus* -näytteistä oli herkkiä analyysissä käytetyille antibiooteille. Stafylokokkinäytteiden taulukoidut tulokset löytyvät liitteestä 2.

Koagulaasinegatiivisten stafylokokkien (KNS) identifikaatioprosentti vaihteli 93–99 % välillä. KNS-näytteiden kohdalla oli muutamia näytteitä, joista teimme jatkotutkimukset. Jatkotutkimusten jälkeen jäi jäljelle kolme minor error -virhettä. Näissä kolmessa näytteessä (T117019, T117041 ja T117042) virhe esiintyi tetrasykliinin kohdalla. Minor error -virheet voivat johtua tetrasykliinin bakteriostaattisesta vaikutuksesta. Näitä muutamaa minor error -virhettä lukuun ottamatta KNS-näytteiden kohdalla Vitek®2-analysaattorin antamien tulosten ja vertailutulostemme välillä ei ollut muita poikkeamia.

MRSA-näytteillä herkkyyskortti toimi hyvin, mutta kahdessa näytteessä ilmeni eroavaisuuksia herkkyystulkinnoissa. Lähes kaikki näytteemme olivat oksasilliiniresistenttejä *Staphylococcus aureus* -lajeja. Yhteisiä antibiootteja tulosvertailuun saimme kymmenen. Yhdessä näytteessä (T110889) oksasilliinin kohdalla Vitek®2-analysaattori teki pohjatietoihin verraten tulkintavirheen, joka luokiteltiin major error -virheeksi. Saa-miemme tietojen mukaan kyseessä oli hankala FIN-10-kanta, jonka oksasilliinin MIC-arvo on matala. Kiekkomenetelmällä oksasilliini on ollut herkkä, mutta Vitek®2-analysaattori sai herkkyudeksi resistentin. Jatkotutkimusten perusteella virhe kuitenkin pystyttiin sulkemaan pois, sillä näytteen resistenssi jää kiinni vain MRSA-maljalla sekä nukleinihappo-osoitusmenetelmällä. Vitek®2-analysaattori oli siis aivan oikeassa tul-kinnassaan.

Näytteen T47156 sulfa-trimetopriimiyhdistelmän tulkinnot erosivat toisistaan ja virheel-linen tulkinta jäi Vitek®2-analysaattorin syyksi. Näyte on aiemmin vastattu herkäksi ky-seessä olevalle antibiootille, mutta Vitek®2-analysaattori sai tulokseksi resistentin. Jat-kotestauksessa sekä kiekkomenetelmä että E-testi totesivat näytteen olevan herkkä.

Näytteen T111989 Vitek®2-tulkinta levofloksasiinin herkkydestä erosi kiekkomenetel-mällä saatuun tulokseen. Aiemmin näyte on vastattu levofloksasiinille herkäksi kiekkomenetelmällä, mutta Vitek®2-analysaattorin tulkinta oli resistentti. Jatkotutkimuksissa E-testillä selvisi, että Vitek®2-analysaattorin tulkinta oli täysin oikea. Virhe voi mahdolli-sesti johtua aiemmasta väärästä tulkinnasta, joka on syötetty Samba-järjestelmään.

Jatkotutkimukset sulkivat myös pois yhden very major error -virheen. Fusidiini on ai-emmin vastattu resistentiksi näytteestä T116921, mutta E-testin perusteella Vitek®2-analysaattori oli jälleen oikeassa. Aiemmin vastatulle poikkeavalle tulkinnaalle on vaike-aa löytää syytä, mutta yksi mahdollisuus on tulkinta- tai mittausvirhe.

## 6.2 Pneumokokkikortti AST-P576

*Streptococcus pneumoniae* -näytteiden tunnistus osoittautui Vitek®2-analysaattorille haastavaksi. Kolmen näytteen kohdalla analysaattori tulkitse pneumokokin *Streptococcus Suis II* -lajiksi, joka vaikutti myös antibioottil herkkyysmääritysten tuloksiin. Puhdasviljelmiin lisäsimme optokiinikiekat varmistaaksemme kyseisen näytteen olevan pneumokokki ja kaikki opinnäytetyössämme käytetyt pneumokokkinäytteet olivat herkkiä optokiinille. Analysaattorissa on kuitenkin mahdollista vaihtaa bakteerilajin nimi manuaalisesti, jolloin puuttuvat herkkyystulokset saadaan näkyviin. Pneumokokkinäytteiden taulukoidut tulokset löytyvät liitteestä 3.

Pneumokokkien kohdalla pahoja virheitä antibioottil herkkyystulkinnoissa ei tullut. Ainoastaan neljä näytettä kahdestakymmenestä joutui jatkotutkimuksiin. Poikkeavat tulokset ilmenivät telitromysiinin, tetrasykliinin sekä sulfa-trimetopriimiyhdistelmän kohdalla. Kolmen näytteen (T106900, T111995 ja T116810) kohdalla herkkyystulkinta oli jokaisella menetelmällä erilainen. Kiekkomenetelmällä tulokseksi saatiin R, Vitek®2-analysaattorin ja E-testin tulokset vaihtelivat intermediaten ja susceptiblen välillä. Kiekkomenetelmän virheellinen tulos on voinut mahdollisesti johtua antibioottil kiekon heikosta kiinnittämisestä. Telitromysiinin kohdalla emme voineet MIC-arvon määrittystä tehdä, sillä käytössämme ei ollut telitromysiinille tarkoitettua E-testiä.

Näytteen pakastaminen voi olla myös syynä näytteen poikkeaviin tuloksiin. Yhdessä näytteessä (T116699) resistentti ominaisuus oli kadonnut kokonaan. Esitetietojen mukaan näyte on ollut resistentti sulfa-trimetopriimiyhdistelmälle, mutta Vitek®2-analysaattori sekä jatkotutkimuksessa E-testi osoittivat kuitenkin näytteen olevan herkkä. Virhelähteitä voi olla useita. Bakteeri on voinut ”sylkäistä” ulos resistenttisyttä ilmentävän geenin tai olemme saaneet maljalle samaa, mutta herkkää kantaa alkuperäisestä bakteeripopulaatiosta.

## 6.3 Streptokokkikortti AST-ST01

Streptokokeille tarkoitettu herkkyyskortti toimi erittäin hyvin ja Vitek®2-analysaattorin antamat tulokset olivat pääosin yhtenäisiä muilla menetelmillä saatujen tulosten kanssa. Streptokokkinäytteet kasvoivat osittain hieman huonosti maljoilla, jolloin analysointiin tarvittavaa bakteerimassaa oli hankalaa saada tarpeeksi. Otoksessamme oli mukana näytteitä jokaisesta streptokokkiryhmästä; A-, B-, C-, G-, *Anginosus* ja *Viridans*.

Vain kuusi 21 näytteestä joutui jatkotutkimuksiin. Streptokokkien taulukoidut tulokset löytyvät liitteestä 4.

A-ryhmän streptokokki eli *Streptococcus pyogenes* -näytteitä opinnäytetyössämme oli neljä kappaletta. Antibioottiherkkyystulkinnoissa ei ollut yhtään poikkeavia tuloksia aikaisempiin määritystuloksiin verrattuna. Identifikaatioprosentit vaihtelivat välillä 95–99%. Kahdesta näytteestä (T114985 ja TT115490) Vitek®2-analysaattori tunnisti myös oikein indusoituvan klindamysiiniresistenssin. Tulokset vertailussa yhteisiä antibiootteja oli vain neljä: erytromysiini, klindamysiini, penisilliini sekä vankomysiini. Yhtä näytettä lukuun ottamatta (T115931) näytteet olivat resistenttejä sekä erytromysiinille että klindamysiinille. Kaikki näytteet olivat herkkiä penisilliinille ja vankomysiinille. A-ryhmän streptokokit ovat vakavia taudinaiheuttajia, joten näiden näytteiden kohdalla olikin tärkeää, että Vitek®2-analysaattori toimi hyvin.

*Streptococcus agalactiae* -näytteitä työssämme oli neljä kuten myös vertailtavia antibiootteja. Bakteeri-identifikaatioprosentit vaihtelivat välillä 97–99%. Vitek®2-analysaattori tunnisti näytteen T109353 kohdalla indusoituvan klindamysiiniresistenssin. ICR-testin ollessa positiivinen, analysaattori vaihtaa myös klindamysiinin tulkinnaksi resistentin, vaikka yksittäisessä määrittämisessä se olisikin herkkä. Kaikki neljä B-ryhmän streptokokkinäytettä olivat penisilliini- sekä vankomysiiniherkkiä. Yhden näytteen kohdalla (T105067) tapahtui minor error -virhe erytromysiinillä. Vitek®2-analysaattori sai herkkyystulokseksi intermediaten ja jatkotestauksessa kiekkomenetelmän sekä E-testin mukaan näyte on kuitenkin herkkä. Intermediate-tulos on kuitenkin epävarma, joten poikkeama ei ollut kovinkaan merkityksellinen.

C- ja G-ryhmien näytteet koostuivat hieman harvinaisemmista kannoista, kuten *Streptococcus dysgalactiae* ja *Streptococcus equi*. Identifikaatioprosentit vaihtelivat välillä 94–99%. Näytteitä tämä ryhmä sisälsi seitsemän ja vertailtavia antibiootteja oli viisi. Yksi näyte tästä ryhmästä (T101121) oli aiemmin vastattu C-ryhmän streptokokiksi Samba-järjestelmään, mutta Vitek®2-analysaattori tunnisti sen *Streptococcus mitis* -lajiksi eli näyte kuuluisi opinnäytetyössämme *anginosus*- ja *viridans* -ryhmien streptokokkeihin. Näytteen T106764 kohdalla Vitek®2-analysaattori teki oman tulkintansa erytromysiinille. MIC-arvon mukaan näyte olisi herkkä kyseiselle antibiootille, mutta Vitek®2-analysaattori vaihtoi tulkinnaksi intermediaten. Tuloksin vaihto perustuu analysaattorin tietokantaan.

*Anginosus*- ja *viridans* -ryhmien streptokokkien kohdalla oli ongelmia. Maljoilla bakteerit kasvoivat heikosti ja jouduimme tekemään viljelyt uudestaan moneen kertaan. Myös Vitek®2-analysaattorin identifikaatioprosentit jäivät välille 90–97%. Vertailtavia antibiootteja oli yhteensä viisi ja näytteitä tässä ryhmässä kuusi. Yhdessä näytteessä (T101460) ilmeni minor error -virhe penisilliinin kohdalla. Perinteisillä menetelmillä kiekon herkkyystulos on ollut herkkä, mutta E-testin tulos on ollut epävarma. Kahdesta *anginosus*-ryhmän näytteestä (T108982 ja T111479) Vitek®2-analysaattori ei antanut herkkyystuloksia lainkaan. Analysaattori terminoi eli keskeyttää herkkyysmäärittelyn, koska bakteeri ei ole todennäköisesti kasvanut lainkaan kontrollikuopassa. Kasvun epäonnistumisen syytä on vaikeaa arvioida. Bakteerien tunnistus onnistui kuitenkin hyvin, sillä identifikaatioprosentit olivat 96 ja 97 %.

#### 6.4 Enterokokkikortti AST-P586

Enterokokkinäytteitä opinnäytetyössämme oli yhteensä 31. Enterokokit aiheuttivat kaikkein eniten haasteita työn toteutuksessa sekä tulosten tulkinnessa. Enterokokkinäytteiden taulukoidut tulokset löytyvät liitteestä 5.

*Enterococcus faecalis* -näytteitä meillä oli mukana kymmenen kappaletta, mutta lopullisessa tulosten yhteenvedossa lukumäärä tippui yhdeksään tulkintavirheen vuoksi. Identifikaatioprosentti näillä näytteillä oli erittäin hyvä, 99 %. *Enterococcus faecalis*ien tuloksissa esiintyi kaksi very major error- sekä kaksi minor error -virhettä. Molemmat very major error -poikkeamat esiintyivät imipeneemin kohdalla (T116022 ja T116068). Näytteen T116022 kohdalla virhe selittyy bakteerin kasvutavasta. Kyseinen laji kasvoi ”ripsuttaen”, jolloin sen tulkinta vaikeutuu. Tämä ripsutus syntyy, kun bakteeri kasvaa heterogeenisinä eli erikokoisina pesäkkeinä maljalla. Tällöin myös bakteerin kasvuraja näkyy epäselvänä kiekkomenetelmällä.

Näytteessä T116068 aiemmissa tuloksissa ampisilliini oli herkkä ja me saimme tulokseksi intermediaten. Toisessa minor errorissa (T116350) aikaisempi tulos imipeneemillä oli ollut I kun taas me saimme tulokseksi S:n. Imipeneemi on antibiootti, jolla esiintyy heteroresistenssiä eli bakteerien herkkyys antibiootille vaihtelee, mitä Vitek®2-analysaattori ei osaa löytää. Kyseisellä heteroresistenssillä voidaan mahdollisesti selittää nämä imipeneemin kohdalla tulleet virheet.

Näytteen T116034 tuloksien poikkeavuuden johdosta näytteestä tehtiin jatkotutkimuksia. Jatkotutkimukset osoittivat että kyseinen bakteeri olikin *Enterococcus faecium* eikä *Enterococcus faecalis*. Näin ollen *Enterococcus faecalis* -näytteidemme lukumäärä väheni yhdeksään ja *Enterococcus faecium* -näytteiden määrä nousi kahteentoista. Kyseisessä näytteessä oli todennäköisesti alun perin ollut tulkintavirhe, kun sitä oli vastattu Samba-järjestelmään. Vitek®2-analysaattori osoitti meille tämän mahdollisesti aikaisemmin tapahtuneen inhimillisen virheen.

*Enterococcus faecium* -näytteiden identifikaatioprosentit vaihtelivat 89–99 % välillä. Yhdeksässä näytteessä Vitek®2-analysaattorin antamat tulokset vastasivat aikaisempia tietoja. Näin ollen vain kolmessa näytteessä oli poikkeamia. Kahdessa näytteessä (T115937 ja T116034) esiintyi minor error -virhe jälleen imipeneemin kohdalla. Aiemmissä tuloksissa molemmat oli vastattu I:ksi, kun taas Vitek®2-analysaattori antoi uudeksi tulokseksi S:n.

Näytteen T116655 kohdalla meillä oli ongelmia. Vitek®2-analysaattori tunnisti tämän kyseisen bakteerin *Enterococcus raffinosus* -lajiksi *Enterococcus faeciumin* sijaan. Näin ollen Vitek®2-analysaattori ei myöskään osannut antaa meille antibioottil herkkyys-  
siä. Saimme herkkyudet näkyviin vasta muuttamalla nimen manuaalisesti *Enterococcus faeciumiksi*. Nimen muutoksen jälkeen saatuja herkkyys-  
siä verrattiin aiempiin herkkyystuloksiin. Vertailussa ilmeni, ettei Vitek®2-analysaattorin antama herkkyys vastannut aiempia tuloksia. Saimmekin esiin kaksi very major error- ja yhden major error -virheen tämän näytteen kohdalla. Päätimme hylätä kyseisen näytteen kokonaan lopullisista tuloksista, koska sen antibioottil herkkyysmäärittäminen ei onnistunut osalle antibiooteista (antoi tulokseksi TRM = terminated). Lisäksi kyseessä ei todennäköisesti ollut ohjaajamme mukaan edes haluamamme enterokokki, joten herkkyyskorttia ei ole kyseessä olleelle lajille validoitu.

VRE-näytteitä (vankomysiinille resistentti enterokokki) työssämme oli mukana kymmenen. Näiden näytteiden identifikaatioprosentit vaihtelivat 89–99 % välillä. Käytimme VRE-näytteiden kohdalla myös kromogeenisia värimaljoja varmistaaksemme kannan oikeaksi, mutta näytteet kasvoivat näillä maljoilla erittäin heikosti. VRE-näytteiden kohdalla esiintyi kaksi very major error -virhettä ja yksi minor error -virhe. Seitsemän näytteen saadut Vitek®2-tulokset vastasivat aiempia tuloksia. Minor error -virhe esiintyi näytteessä T103161 vankomysiinin kohdalla. Saamamme resistentti tulos ei tukenut aiemmin saatua epävarmaa (intermediate) tulosta.

Very major error -virhe esiintyi näytteissä vankomysiinin (T108931) kohdalla ja teikoplaniinin (T11173) kohdalla. Näytteen T108931 kohdalla voidaan Vitek®2-analysaattorin virhe selittää kyseisen bakteerin kasvutavalla antibiootin läsnäollessa. Tälle kyseiselle bakteerille on ominaista kasvaa ”ripsuttaen” jolloin sen tulkinta vaikeutuu. Bakteerin resistenssi vankomysiinille saadaankin tunnistettua E-testillä ja nukleiinihappo-osoituksella. Vitek®2-analysaattori ei siis kykene tunnistamaan tämän *Enterococcus faecium* -lajin herkkyyttä oikein.

Kolmessa *vanC*-lajin (T69204, T107099 ja T111940) vankomysiinin tulkinnoissa Vitek®2-analysaattori oli tietokantaansa perustuen muuttanut bakteerien herkkyyden kyseiselle antibiootille resistentiksi. Näille kolmelle näytteelle ei saada vankomysiiniä R:ksi tai I:ksi kiekkomenetelmällä tai E-testillä, sillä *vanC*-geeni ilmenee näillä menetelmillä niin heikosti. Kiekkomenetelmällä ja E-testillä tehtäessä herkkyyismäärittystä, annetaan näistä lajeista kommenttina ”kyseessä olevan lajin herkkyys vankomysiinille on luontaisesti jonkin verran alentunut”. Näin ollen voidaan sanoa, että Vitek®2-analysaattori pääsee samaan tulokseen tulkitsemalla vankomysiinin alentuneeksi bakteerin nimen perusteella, esimerkiksi silloin, kun MIC = 4 = S. Tässä tilanteessa tulee hyvin esille nimen suuri merkitys oikealle antibioottiherkkyydetulkinnalle.

## 6.5 Yhteenveto

Kokonaisuudessaan Vitek®2-analysaattori toimi antibioottiherkkyyismäärittäyksissä hyvin. Tulokset vastasivat suuremmilta osin kiekkomenetelmällä ja E-testillä saamia herkkyydetuloksia. Suurin osa poikkeamista oli minor error -virheitä, joiden merkitys on melko vähäinen. Resistentin ja herkän tuloksen väliin jäävän puskurivyöhykkeen, I-alueen, tärkein tarkoitus on ehkäistä menetelmän epätarkkuudesta johtuvia virheitä. Tulos on kuitenkin epävarma, jolloin kyseessä olevaa antibioottia ei suositella otettavan käyttöön ainakaan normaalilla annostuksella. Alla olevassa taulukossa on esitelty poikkeamien lukumäärien yhteenveto herkkyysskorteittain (taulukko 1).

Taulukko 1. Opinnäytetyömme poikkeamien yhteenveto herkkyysskorteittain.

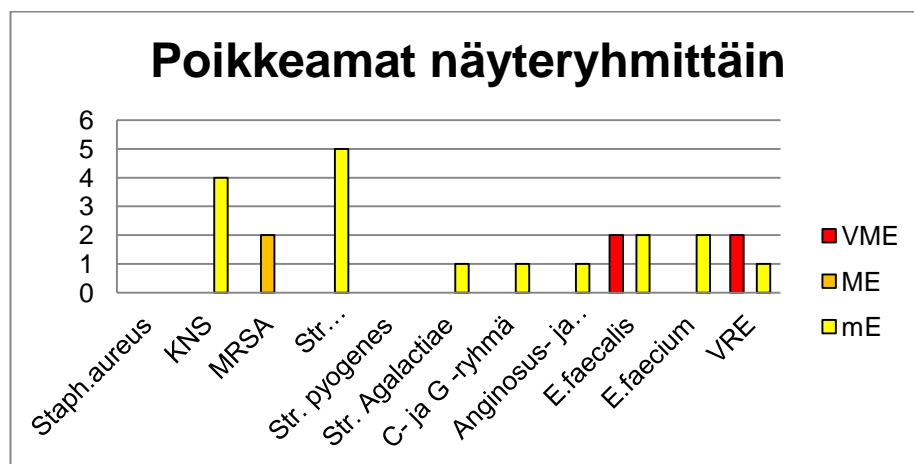
Poikkeamien yhteenveto			
Herkkyysskortti	Very major error	Major error	Minor error
AST-P580	0	2	4
AST-P576	0	0	5
AST-ST01	0	0	3
AST-P586	4	0	5



Minor error -virheitä esiintyi jokaisessa korttiryhmässä. Eniten näitä poikkeamia esiintyi enterokokki- sekä pneumokokkikorteissa. Nämä lajit olivat muutenkin työssämme haastavimpia. Osalla maljoista kasvu oli heikkoa ja vaadittavan 0,5 McF vahvuisen bakteerisuspension valmistaminenkin oli välillä haastavaa. Hyvästä hajotuksesta huolimatta bakteerimassaa piti ottaa myös paksummalta alueelta, joka taas voi vaikuttaa virheellisesti tuloksiin, vaikka massaa otettiin puhdasviljelmältä. Tunnistus meni muutamien näytteen kohdalla väärin. Vitek®2-analysaattorin mielestä laji oli aivan toinen, mitä tallennetiedot kertoivat. Näiden näytteiden kohdalla vaihdoin manuaalisesti bakteerilajin nimen, jotta saimme lääkeherkkyudet näkyviin. Yhden näytteen hylkäsimme kokonaan lopputuloksista, sillä tunnistus- eikä herkkyysmääritykset onnistuneet lainkaan.

Major error -poikkeamia opinnäytetyössämme esiintyi vain kaksi. Molemmat virheet ilmenivät MRSA-näytteissä. Toisen näytteen virheen mahdollisesti selittää positiivinen kefoksitiini-seulonta, joka perinteisillä menetelmillä ei tulisi esiin.

Alla olevassa kuviossa (kuvio 9) olemme jakaneet virheet näytteryhmittäin. Very major error -virheitä esiintyi ainoastaan enterokokkikortissa. Ongelmia oli varsinkin VRE- ja *Enterococcus faecalis* -näytteissä. Aiempien tutkimusten tuloksiin verraten omat tuloksemme olivat samankaltaisia. Tunnistus ja antibioottiherkyyden määrittäminen on selkeästi heikompaa näillä lajeilla kuin muissa opinnäytetyössämme käytetyillä bakteerilajeilla. Neljän very major error -virheen lisäksi enterokokkiryhmissä esiintyi viisi minor error -poikkeamaa. Kaikki nämä enterokokkien kohdalla esiintyvät virheet puoltavat Vitek®2-analysaattorin tietokannan säätämistä tai herkkyyskortin kehittämistä.



Kuvio 9. Poikkeamat näytteryhmittäin.

Yksittäisiä antibiootteja tarkastellessa (taulukko 2) huomataan, että virheitä kohdistui eniten imipeneemille. Imipeneemin kohdalla esiintyi kaksi very major error- sekä kolme minor error -virhettä ja kaikki poikkeamat tapahtuivat enterokokkien kohdalla. Enterokokeissa esiintyi myös kaksi muuta very major error -virhettä. Nämä kaksi virhettä tulivat esiin VRE-lajeissa teikoplaniinin ja vankomysiinin kohdalla. Vankomysiini ja teikoplaniini kuuluvat molemmat glykopeptidien ryhmään eli ne ovat samankaltaisia antibiootteja. Tämä samankaltaisuus voikin osalta selittää molempien antibioottien kohdalla esiintyneet very major error -virheet. Näiden kantojen antibioottiherkkyyssmäärityksissä olisi suositeltavaa varmistaa herkkyys Vitek®2-analysaattorin lisäksi myös esimerkiksi E-testillä.

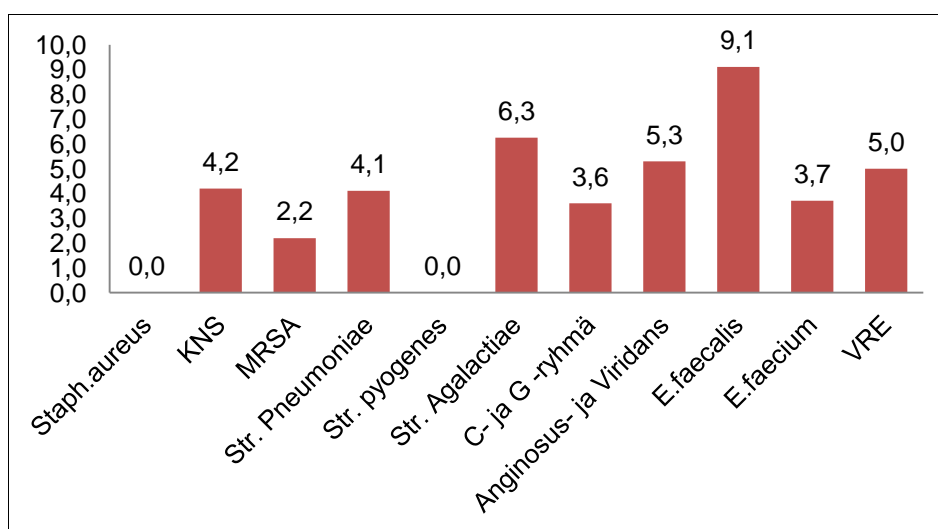
Taulukko 2. Poikkeamat antibioottien mukaan.

Antibiootti	Poikkeamat		
	VME	ME	mE
Ampisilliini			1
Erytromysiini			2
Fusidini			
Gentamysiini-high			
Imipeneemi	2		3
Klindamysiini			
Kloramfenikoli			
Levofloksasiini			
Linezolidi			
Moksifloksasiini			
Mupirosiini			
Nitrofurantoiini			
Oksasilliini		1	
Penisilliini			1
Rifampisiini			
Teikoplaniini	1		
Telitromysiini			3
Tetrasykliini			4
Tigesykliini			
Tobramysiini			
Trimetopriimi/sulfanamidi		1	2
Vankomysiini	1		1
yht.	4	2	17

Enterokokit aiheuttivat selkeästi ongelmia Vitek®2-analysaattorille. Imipeneemin kolme minor error -virhettä emme voineet tarkistaa jatkotutkimuksilla, sillä juuri näiden näytteiden kohdalla imipeneemin E-testiliuskat olivat hetkellisesti loppuneet. MRSA-lajien kohdalla esiintyivät ainoat major error -virheet. Toinen virhe oli oksasilliinilla ja toinen sulfa-trimetopriimiyhdistelmällä. Sulfa-trimetopriimiyhdistelmän kohdalla esiintyi

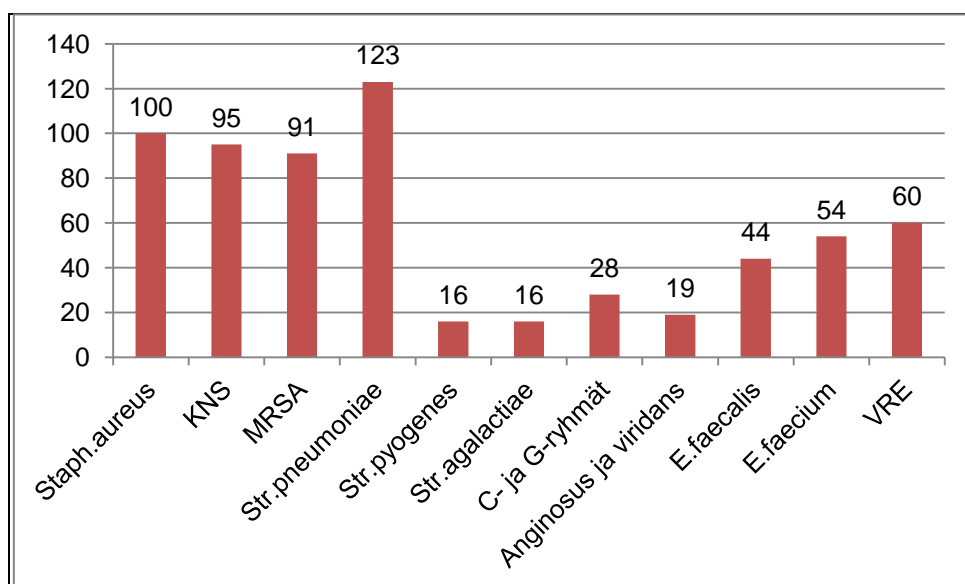
lisäksi myös kaksi minor error -virhettä. Loput minor error -virheet olivat jakautuneet useammalle eri antibiootille. Eniten minor error -virheitä esiintyi tetrasykliinillä (n=4).

Kun aloimme tarkastella tuloksia tilastollisesti, huomasimme, että näyteryhmien virheprosentilla on melko vähäinen merkitys opinnäytetyömme tulosten luotettavuudessa, sillä vertailuissa käytettävien antibioottien ja näytteiden määrät vaihtelivat suuresti. Myös virheiden vakavuus vaihtelee. Opinnäytetyömme näyteryhmien virheiden prosentuaaliset määrät eivät siis ole millään tavalla keskenään vertailukelpoisia. Kuviossa 10 on esitetty virheprosentit näyteryhmittäin. Esimerkiksi *Streptococcus agalactiae* -näytteitä oli opinnäytetyössämme neljä kappaletta, joissa vain yhdessä esiintyi yksi minor error -virhe yhden antibiootin kohdalla. Vertailtavia antibiootteja oli vähän, joten virheprosentiksi saatu 6,3 % antaa väärienlaisen kuvan määrityksen onnistumisesta. Näytteitä ja tulosten vertailussa käytettäviä antibiootteja olisi pitänyt olla enemmän jokaisessa näyteryhmässä, jotta tuloksia voitaisiin järkevästi käsitellä tilastollisesti ryhmittäin.



Kuvio 10. Virheprosentit näyteryhmittäin.

Opinnäytetyömme tulosten kokonaisuutta arvioidessa tulosvertailussa määrityksiä oli yhteensä 646 (kuvio 11). Tulosvertailuun otettiin siis mukaan ne antibiootiherkkyytulokset, joista löytyi oman tuloksemme lisäksi myös Samba-järjestelmään kirjattu aikaisempi herkkyystulos. Näistä virheellisiä oli 23, joka kertoo virheprosentiksi 3,6 %. Vittek<sup>®</sup>2-analysaattorin tulokset vastasivat siis aiempia tuloksia 96,4 %, joka kertoo laitteen toimivuudesta paljon.



Kuvio 11. Tulokset vertailun lukumäärät näyteryhmittäin.

## 7 Tulosten luotettavuuden arviointi ja toistettavuus

Yksi mahdollinen virhelähde opinnäytetyössämme oli näytteiden pakastaminen. Mikäli olisi ollut mahdollista, olisi työmme kannalta ollut parasta tehdä Vitek®2-analysointi pakastamattomista näytteistä. Näytteistä on tehty tarvittavat määritykset silloin, kun ne ovat ensimmäisen kerran tulleet bakteriologian osastolle tutkittavaksi. Tämän jälkeen näytteet on merkitty tallennenumera ja pakastettu. Pakastaminen on voinut muuttaa bakteerien ominaisuuksia, esimerkiksi muuttamalla niiden sietokykyä antibiooteille. Tuoreita näytteitä käytettäessä olisi voitu pois sulkea pakastamisesta johtuneet muutokset. Käytimme työssämme erilaisia bakteerilajeja, joita bakteriologian osasto oli kerännyt vuosia. Nämä näytteet vaihtelivat mikrobilääkkeen sietokyvyiltään herkästä resistentteihin lajeihin. Näin ollen työn toteutukseen varattu aika ei olisi riittänyt tuoreinäytteiden keräämiseen, jotta otos olisi ollut yhtä suuri ja kattava.

Toisena virhelähteenä voisimme mainita sen, että analysoimme näytteemme vain Vitek®2-analysointilaitteella ja ainoastaan poikkeamien kohdalla tehtiin jatkotestaukset muilla menetelmillä. Tulosten luotettavuutta olisi lisännyt se, että pakasteesta haettu näyte olisi analysoitu samanaikaisesti Vitek®2-analysointilaitteen lisäksi kaikilla muillakin saatavilla olevilla menetelmillä (kiekkomenetelmä ja E-testi). Näin ollen pakastamisen merkitys poistuisi tulosten tulkinnasta, kun saatuja tuloksia ei olisi tarvinnut verrata ennen pakastamista saatuihin tuloksiin. Lisäksi olisi poissuljettu mahdolliset tulkinta- ja mittaus-

virheet aiemmissa Samba-järjestelmän tulkinnoissa. Tajusimme tämän vaihtoehdon työelämän ohjaajan kanssa vasta työn toteutuksen jälkeen. Toisaalta työmäärä olisi kasvanut liian suureksi kahdelle henkilölle toteutettavaksi suunniteltuun aikatauluun nähden.

Lisää mahdollista virhelähdettä työhömmе tuo myös se, että näytteiden käsittelyssä on voinut tapahtua kontaminaatioita. Näytteiden pakastusvaiheessa on voinut säilytyksessä käytettävään muoviampulliin päästä kontaminantti esimerkiksi näytteen käsittelijän huolimattomuuden johdosta. Lisäksi samassa näytteessä on voinut olla sekä resistenttiä että herkkää bakteerikantaa. Tällaista näytettä ottaessamme viljelymaljalle on voinut valikoitua vain toinen näistä lajeista. Näin ollen aiempien tulosten ja saamiemme tulosten välille on voinut tulla virhe. Eli olemme halunneet lajin, joka on resistentti tietyille antibiootille aiempien tulosten mukaisesti, mutta saammekin elatusmaljalle antibiootille herkän lajin. Toisaalta olemme voineet myös itse kontaminoida näytteitä prosessin aikana. Kävimme kuitenkin selvästi kontaminoituneet viljelmät läpi työelämän ohjaajien kanssa, jotka varmistivat oikeat lajit silmämääräisesti. Tämän jälkeen teimme puhtasviljelmät valituista yksittäisistä bakteeripesäkkeistä.

Virhelähteenä meillä oli myös telitromysiinin E-testin puuttuminen. Olisimme halunneet testata muutaman näytteen kohdalla sattuneet minor error -virheet telitromysiinin E-testillä, mutta näitä liuskoja ei ollut ollenkaan saatavilla bakteriologian osastolla. Näin ollen emme voi olla varmoja, onko virhe Vitek®2-analysaattorista johtuva. E-testiliuskojen puuttumista koimme myös imipeneemin kohdalla, sillä kyseiset liuskat pääsivät hetkellisesti loppumaan bakteriologian osastolta. Saimme tarpeeksi liuskoja testataksemme very major error -virheet, mutta minor error -poikkeamat jouduimme jättämään ilman jatkotutkimuksia. Opinnäytetyössämme oli kuitenkin tarkoitus kiinnittää huomiota eniten very major error- ja major error -virheisiin. Minor error -virheet olisimme saaneet jättää kokonaan huomioimatta eli kyseisistä näytteistä ei olisi tarvinnut tehdä jatkotutkimuksia kiekko- sekä E-testimenetelmillä. Kyseiset minor error -virheet kuitenkin häiritsivät meitä sen verran, että tahdoimme alusta asti tehdä näistäkin näytteistä kaikki mahdolliset jatkotutkimukset. Koimme saavamme lisää selkeyttä tuloksiin tällä tavoin. Saimme myös pois suljettua muutaman minor error -virheen jatkotestauksen avulla.

Analysaattorin herkkyyskorttien ohjeissa on mainittu antibiootit, joiden kohdalla tietyillä bakteerilajeilla tulisi tehdä Vitek®2-analysaattorin lisäksi varmistus herkkyydestä jollain

vaihtoehtoisella menetelmällä. Esimerkiksi *Streptococcus pneumoniae* -näytteillä käytetyssä AST-P576-kortissa suositellaan jotain toista herkkyysmenetelmää lukuisille antibiooteille (amoksisilliini, imipeneemi, linezolidi, rifampisiini, telitromysiini), koska valmistajalla ei ollut käytössä testauksessaan näille antibiooteille resistenttejä kantoja. Lisäksi jäimme pohtimaan vankomysiinin toimivuutta, sillä kaikki *Staphylococcus aureus* -näytteemme olivat vankomysiiniherkkiä, emmekä voi tietää, olisiko Vitek®2-analysaattori löytänyt tästä näyteryhmästä resistentit kannat.

Työmme tulosten luotettavuutta olisi myös huomattavasti lisännyt näytteiden rinnakkaismääritykset. Olisimme näin saaneet tuloksille lisävarmuutta, mutta tämä idea tuli liian myöhään esille. Lisäksi työn määrä olisi kasvanut paljon suuremmaksi ja olisimme tarvinneet toteutukseen lisää resursseja.

Näytteitä meillä oli kaiken kaikkiaan 102. Eri lajeja oli tarpeeksi, mutta näytteitä jokaisessa bakteeriryhmässä oli liian vähän. Suurempi näytemäärä olisi lisännyt tulosten luotettavuutta sekä tulokset olisivat olleet helpommin tilastollisesti vertailtavissa. Suurempi näytemäärä olisi kuitenkin vaatinut enemmän toteutusaikaa, resursseja bakteriologian osastolta sekä useamman työntekijän.

## 8 Pohdinta

Työtä oli helppoa ja mielekästä tehdä, sillä koimme opinnäytetyömme aiheen mielenkiintoiseksi. Mikrobiologian aihealueet kiinnostivat meitä molempia jo ennen opinnäytetöiden aiheiden julkistamista. Näin ollen oli helppoa valita aihe sekä luoda toimiva yhteistyö opinnäytetyötä varten. Innostusta työn tekemiseen lisäsi myös tieto työelämän tarpeesta työmme tuloksille, sillä grampositiivisten bakteerien antibioottilherkkyysmääritykset eivät vielä olleet vakituisesti käytössä Vitek®2-analysaattorilla HUSLABin bakteriologian osastolla.

Tiedonhaku oli alussa melko haastavaa. Etenkin aiempia tutkimuksia Vitek®2-analysaattorista oli vaikeaa löytää. Mikäli tutkimuksia löytyi, koskivat ne pääasiassa gramnegatiivisia bakteereita, hiivoja tai pelkästään bakteerien identifikaatioita. Ahkeran etsimisen jälkeen löysimme kuitenkin muutamia työmme kannalta oleellisia tutkimuksia liittyen Vitek®2-analysaattoriin. Näistä muutamasta tutkimuksesta valitsimme kolme lopulliseen viitekehykseemme. Kaikki löytämämme tutkimukset olivat englannin kielisiä, joten ammatillinen sanastomme mikrobiologian osalta kehittyi merkittävästi. Saimme

myös lisää kokemusta tutkimusten tarkastelusta kriittisesti. Näistä kehittyneistä taidoista tulee varmasti olemaan meille hyötyä ammatissamme myös tulevaisuudessa.

Opinnäytetyömme työvaiheet koostuivat esitutkimuksesta sekä varsinaisesta toteutussosasta. Koimme esitutkimuksen suorittamisen hyödylliseksi ja oli hyvä, että tällainen mahdollisuus oli järjestettävissä. Esitutkimuksen ansiosta saimme kokonaiskuvan tulevasta työn varsinaisesta toteutusvaiheesta. Näin ollen aikataulun suunnittelu helpottui huomattavasti. Lisäksi esitutkimuksen ansiosta pystyimme toteutusvaiheessa työskentelemään itsenäisesti. Vain ongelmatapauksissa turvauduimme työelämän ohjaajiin.

Työmme näytteet olivat bakteriologian osaston keräämiä potilasnäytteitä, jotka oli varastoitu pakastimiin tallennenumeroilla. Nimesimme näytteet opinnäytetyöhömme näiden tallennenumeroitten mukaan, joten potilastiedot pysyivät suojattuina. Lisäksi meidän ei tarvinnut pyytää potilailta lupaa tutkimuksiin, sillä näytteitä ei otettu erikseen tätä työtä varten. Näin pystyimme ottamaan huomioon bioanalyttikon eettiset näkökulmat opinnäytetyössämme.

Eettistä näkökulmaa opinnäytetyöhömme tuo myös Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorin antamat nopeat herkkyystulokset, jotka mahdollistavat tehokkaimman mikrobilääkityksen aloittamisen potilaalle entistä nopeammin. Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorin ansiosta bakteriologian osastolla voidaan kiireelliset näytteet laittaa aamulla analysaattoriin tulkittavaksi ja tulokset ovat usein valmiina jo iltapäivällä tai illalla. Opinnäytetyömme näytteiden analyysiaika oli kolmesta kahdeksaan tuntia, esimerkiksi metisilliiniresistenttien *Staphylococcus aureusten* keskimääräinen analyysiaika oli hieman yli neljä tuntia. Näin ollen kiireellisten näytteiden tulokset saadaan mahdollisesti valmiiksi saman päivän aikana. Tämä käytäntö on jo käytössä gramnegatiivisten bakteerien kohdalla ja opinnäytetyömme tulosten perusteella sitä voitaisiin laajentaa myös grampositiivisiin bakteereihin.

Vitek<sup>®</sup>2-analysaattori tunnisti onnistuneesti ja nopeasti merkittävät sairaalainfektioita aiheuttavat kannat. Teoriassa tätä analysaattorin ominaisuutta voitaisiin hyödyntää sairaalahygienian parantamisessa, eli hoitohenkilökuntaa voidaan informoida entistä nopeammin tartuntavaarasta. Näin ollen osastolla voidaan tehdä tarvittavat toimenpiteet (esimerkiksi eristys) välittömästi tulosten tultua. Käytännössä tämän toteutuminen kuitenkin tarvitsee tiiviimpää yhteistyötä laboratorion ja hoitohenkilökunnan välillä.

Ammatillisesta näkökulmasta katsottuna salassapitovelvollisuus on itsestäänselvyys potilasnäytteitä käsitellessä. Tallennenumeroiden sijasta pohdimme käyttävämme omaa numerointia, esimerkiksi juoksevaa numerointia, sillä koimme tallennenumerot melko pitkiksi. Päädyimme kuitenkin tallennenumeroiden käyttöön, sillä tulosten tulkinta oli näin helpompaa. Näin Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorin ja aiempien menetelmien tuloksissa oli sama numerointi, mikä teki tulosten vertailusta nopeampaa. Tallennenumeroiden käyttöä puolsi myös se, että jos tulevaisuudessa halutaan käyttää näitä samoja näytteitä, on meidän saamamme näytekohtaiset tulokset helposti löydettävissä.

Verratessamme saamiamme bakteerien tunnistustuloksiamme aiempien tutkimusten tuloksiin, huomasimme tunnistusten olevan samaa tasoa keskenään. Enterokokkien kohdalla opinnäytetyössämme sekä Ligozzi ym. ja Garcia-Garrote ym. tutkimuksissa esiintyneet tunnistusongelmat olivat samankaltaisia. Opinnäytetyömme tulokset vahvistivat Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorin heikkouden tunnistaa enterokokkilajeja oikeiksi.

Antibioottiherkkyksissä opinnäytetyömme tulokset vastasivat muiden tutkimusten lopputuloksia. Ligozzi ym. tutkimus muistutti eniten omaa työtämme työvaiheineen sekä bakteerilajeineen. Näin ollen pystyimme vertaamaan omia tuloksiamme kyseiseen tutkimukseen hyvin. Ligozzi ym. tutkimuksen antibioottiherkkyksien Vitek<sup>®</sup>2-analysaattorin tulosten vastaavuus vertailumenetelmien tuloksiin oli 96 %. Oman työmme vastaava prosenttiluku oli 96,4 %. Ligozzi ym. tutkimuksen näytemäärä oli huomattavasti suurempi, mutta virhemäärä suhteutettuna näytemäärään oli samaa luokkaa kuin omassa työssämme. Molemmissa töissä very major error -virheitä esiintyi enemmän kuin major error -virheitä ja suurin osa poikkeamista oli minor error -virheitä.

Opinnäytetyömme tuloksia verratessa Junkins ym. tutkimukseen, huomasimme tulosten olevan yhteneviä MRSA-näytteillä. Opinnäytetyössämme esiintyi kaksi major error -virhettä, joka kymmenestä näytteestä ja kymmenestä vertailtavasta antibiootista antaa virheprosentiksi 2 %. Junkins ym. tutkimuksessa kyky tunnistaa MRSA oli 98,2 % ilman kefoksitiini-seulontaa. Tunnistusprosentti nousi 99,8 prosenttiin, kun kefoksitiini-seulonta otettiin mukaan. Toisessa opinnäytetyömme poikkeamassa kefoksitiini-seulonta oli positiivinen, joka mahdollisesti selittää toisen major error -virheen. Näin ollen myös opinnäytetyömme MRSA-näytteiden tunnistus nousi 99 prosenttiin.

Tämän aiheen tutkimista voisi jatkaa tarvittaessa suuremmalla näytemäärällä. Lisäksi tämä työ voitaisiin toteuttaa aiemmin mainitulla tavalla eli analysoida näytteet samanai-



kaisesti Vitek®2-analysaattorilla sekä perinteisillä menetelmillä. Etenkin enterokokkien kohdalla voisi lisätutkimus olla paikallaan, sillä juuri näiden näytteiden kohdalla esiintyi eniten virheitä. Lisätutkimuksen tarve enterokokeille kävi myös esille Vitek®2-analysaattoriin liittyvässä aiemmassa Garcia-Garrote ym. tutkimuksessa.

Omasta mielestämme onnistuimme opinnäytetyössämme hyvin. Vitek®2-analysaattorilla suoritettavat bakteerin tunnistamisen ja antibioottiherkkyysmäärityksen työvaiheet oli helppoa ja nopeaa oppia. Bakteerisuspension valmistaminen oli yksi haastavimmista työvaiheista, koska sen tekemisestä meillä oli vain vähän aikaisempaa kokemusta. Useat työmme bakteerilajeista olivat niin heikkokasvuisia, että suspension teko tuntui välillä tuskalliselta. Tällaisten lajien kohdalla voisi harkita jotain muuta menetelmää antibioottiherkkyysmäärityksiin kuin Vitek®2-analysaattoria. Heikosti kasvavien lajien kohdalla laadukkaiden puhdasviljelmien teko oli myös haastavaa. Toisaalta näiden lajien kohdalla koimme suurta onnistumisen tunnetta, kun näimme hyvin hajonneen puhdasviljelmän tai saimme nopeasti aikaan oikean vahvuisen suspension.

Mikäli aloittaisimme opinnäytetyömme tekemisen uudestaan, analysoisimme tutkittavat näytteet Vitek®2-analysaattorilla sekä perusmenetelmillä samanaikaisesti. Näin menetelmällä saisimme luotettavampia tuloksia aikaiseksi, mutta tarvitsisimme mitä luultavimmin kolmannen työntekijän opinnäytetyöhön. Varautuisimme myös paremmin jatkotutkimusten tekemiseen ja tulosten käsittelyyn, sillä tähän emme olleet alkuun tajunneet paneutua tarpeeksi paljoa. Paremmalla varautumisella olisimme säästyneet tulosten käsittelyvaiheessa turhalta työltä. Onneksi kuitenkin olimme valmistautuneet muuten hyvin koko työhön ja näin ollen jatkojen tulosten tuoma pieni lisätyö ei tahtiamme hidastanut.

Kokonaisuudessaan opinnäytetyössämme oli 646 määritystä, joista virheellisiä vain 23. Vitek®2-analysaattorin onnistumisprosentiksi saadaan 96,4 %, mikä kertoo laitteen toimivan erittäin hyvin. Tutkimuskysymyksemme oli ”Vastaavatko Vitek®2-analysaattorin antamat antibioottiherkkyystulokset perinteisten menetelmien tuloksia.” Työmme tulosten perusteella voimme todeta Vitek®2-analysaattorin soveltuvan antibioottiherkkyysmäärityksiin grampositiivisille bakteereille tietyin varauksin.

## Lähteet

Agthe, Niina – Kanerva, Mari – Kolho, Elina – Kotilainen, Pirkko – Kujala, Pekka – Levola, Ritva – Lumio, Jukka – Lyytikäinen, Outi – Peltonen, Reijo – Routamaa, Marianne – Sammalkorpi, Kari – Salmenlinna, Saara – Tarkka, Eveliina – Vuento, Risto – Vuopio-Varkila, Jaana 2004. Ohje metisilliiniresistenttien *Staphylococcus aureus* torjunnasta. Kansanterveyslaitos. Helsinki 2004. Verkkodokumentti.

<<http://www.ktl.fi/attachments/suomi/osastot/infe/julkaisut/mrsa2004.pdf>>. Luettu 24.08.2012.

Bakteerien luonnollinen lääkeresistenssi 2009. FiRe - Suomalainen mikrobilääkeresistenssin tutkimusryhmä. Verkkodokumentti.

<[http://www.finres.fi/fileadmin/files/standardi/liite\\_8\\_bakteerien\\_luonnollinen\\_resistenssi.pdf](http://www.finres.fi/fileadmin/files/standardi/liite_8_bakteerien_luonnollinen_resistenssi.pdf)>. Luettu 22.08.2012.

BD Purple Agar Base. Valmistajan käyttöohje. Becton Dickinson OY. Verkkodokumentti. <[http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco\\_BBL/211558.pdf](http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/211558.pdf)>. Luettu 04.09.2012.

BioMérieux 2008. Vitek®2 Systems Product Information. Analysaattorin käyttöohje. USA.

BioMérieux 2010. Herkkyyskorttien sisältämät antibiootit. Tuoteseloste. Helsinki 2010.

Carlson, Petteri – Koskela, Markku 2011. Bakteriologian tutkimukset. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Infektiosairaudet. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 3. Helsinki: Duodecim. 37–53.

Coxon, Geoffrey 2011. Antituberculosis drugs. Teoksessa Watson, David G (toim.): Pharmaceutical chemistry. Churchill livingstone. United Kingdom. 468–472.

EUCAST 2012. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Verkkodokumentti. <<http://www.eucast.org/>>. Luettu 07.05.2012.

FiRe 2011. Suomalainen mikrobilääkeresistenssin tutkimusryhmä. Verkkodokumentti. <<http://www.finres.fi/index.php?id=2>>. Luettu 07.05.2012.

Garcia-Garrote, Fernando – Cercenado, Emilia – Bouza, Emilio 2000. Evaluation of a New System, VITEK 2, for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 38 (6). 2108–2111.

Hautala, Timo – Lumio, Jukka 2005. Antibioottien käyttö sairaalassa – ohjata vai rajoittaa? Lääketieteellinen Aikakausikirja Duodecim 15/2005. 1683–1688.

Huovinen, Pentti 2009. Mikrobilääkkeiden käytön ekologia. Teoksessa Jousimaa, Jukka – Alenius, Heidi – Atula, Sari – Kattainen, Anna – Kunnamo, Ilkka – Teikari, Martti (toim.): Lääkäriin käsikirja. Helsinki: Duodecim. 1106–1107.

Junkins, Alan D. – Lockhart, Shawn R. – Heilmann, Kristopher P. – Dohrn, Cassie L. – Von Stein, Diana L. – Winokur, Patricia L. – Doern, Gary V. – Richter, Sandra S. 2009. BD Phoenix and Vitek 2 Detection of *mecA*-Mediated Resistance in *Staphylococcus aureus* with Cefoxitin. *Journal of Clinical Microbiology*. 47 (9). 2879–2882.

Järvinen, Asko – Vaara, Martti – Huovinen, Pentti – Liippo, Kari – Vasankari, Tuula 2011. Bakteerilääkkeet. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Infektiosairaudet. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 3. Helsinki: Duodecim. 112–187.

Kainulainen, Katariina – Lyytikäinen, Outi – Vuopio-Varkila, Jaana – Syrjälä, Hannu 2006. Vankomysiinienterokokki (VRE) Suomessa. Kansanterveys 5-6/2006. 22–23.

Kauma, Heikki – Virolainen-Julkunen, Anni 2010. Pneumokokki. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia, Immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Duodecim. 112–121.

Kerttula, Anne-Marie 2009. Staphylococcus aureuksen tunnistaminen värimaljalla. Esitys. HUSLAB 2009.

Ligozzi, Marco – Bernini, Cinzia – Bonora, Maria Grazia – de Fatima, Maria – Zuliani Jessica – Fontana, Roberta 2002. Evaluation of the VITEK 2 System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Medically Relevant Gram-Positive Cocci. Journal of Clinical Microbiology. 40 (5). 1681–1686.

Lindholm, Laura – Eerola, Erkki 2010. Bakteerien luokittelu ja tyypittäminen. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia, Immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Duodecim. 56–67.

Meurman, Olli 2011. Kromogeeniset maljat primaariviljelyssä. Moodi 4. 108–111.

Männistö, Pekka – Tuominen, Raimo 2007. Yleistä mikrobilääkkeistä. Teoksessa Koululu, Markku – Tuomisto, Jouko (toim.): Farmakologia ja toksikologia. 7.painos. Medicina. 789–801.

Nissinen, Antti 2009a. Bakteerin lääkeherkkyyden määrittäminen kiekkomenetelmällä, versio 6. FiRe. Verkkodokumentti.  
<<http://www.finres.fi/fileadmin/files/standardi/kiekkomenetelma.pdf>>. Luettu 16.8.2012.

Nissinen, Antti 2009b. Täydentävät menetelmät. Versio 6. FiRe. Verkkodokumentti.  
<[http://www.finres.fi/fileadmin/files/standardi/liite\\_6\\_taydentavat\\_menetelmat.pdf](http://www.finres.fi/fileadmin/files/standardi/liite_6_taydentavat_menetelmat.pdf)>. Luettu 24.8.2012.

Pincus, David H. 2007. Microbial identification using the bioMérieux Vitek®2 system. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. 1–32.

Puhakka, Jaakko – Salkinoja-Salonen, Mirja 2002. Bakteerien solukuori. Teoksessa Salkinoja-Salonen, Mirja (toim.): Mikrobiologian perusteita. Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. Helsingin yliopisto. 98–111.

Puohiniemi, Ritvaleena 2012. Mikrobiologi, HUSLAB. Helsinki. Kirjallinen tiedonanto 7.2.2012.

Rantakokko-Jalava, Kaisu – Anttila, Veli-Jukka 2010. Muut streptokokit, enterokokit ja muita grampositiivisia kokkeja. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia, Immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Duodecim. 122–129.

Roslund, Iira 2012. Bioanalytiikka, HUSLAB. Helsinki. Kirjallinen tiedonanto 10.02.2012.

Ruotsalainen, Eeva 2009. Streptokokkiepidemiat kuriin päiväkodeissa ja kouluissa. Suomen Lääkärilehti 51–52/2009. 4428.

Salkinoja-Salonen, Mirja 2002. Toisenvaraisten mikrobien aineenvaihdunta. Teoksessa Salkinoja-Salonen, Mirja (toim.): Mikrobiologian perusteita. Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. Helsingin yliopisto. 210–275.

Saxén, Harri – Vuopio-Varkila, Jaana 2010. B-ryhmän streptokokki. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia, Immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Duodecim. 110–111.

Skurnik, Mikael 2010. Bakterigenetiikka. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia, Immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Duodecim. 41–55.

Smith, Anthony 2004. Bacterial resistance to antibiotics. Teoksessa Denyer, Stephen – Hodges, Norman – Gorman, Sean (toim.): Hugo & Russell's Pharmaceutical Microbiology. Seventh edition. Blackwell 2004. 220–232.

Lyytikäinen, Outi – Jalava, Jari – Siira, Lotta – Virolainen-Julkunen, Anni 2012. Tartuntataudit Suomessa 2011. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. Raportti 36/2012. Tampere 2012.

Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta 2012. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. Verkkodokumentti. <<http://www3.ktl.fi/>>. Luettu 17.08.2012.

Vaara, Martti 2009. Tauteja aiheuttavien mikrobien evoluutio haasteena lääketieteelle. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 18/2009. 2001–2006.

Vaara, Martti – Skurnik, Mikael – Sarvas, Matti 2010. Bakterisolun rakenne ja toiminta. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia, Immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Duodecim. 14–40.

Vuopio-Varkila, Jaana – Kuusela, Pentti – Kotilainen, Pirkko 2010. Staphylococcus aureus. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia, Immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Duodecim. 83–97.

Vuopio-Varkila, Jaana – Syrjänen, Jaana – Kotilainen, Pirkko 2010. A-ryhmän streptokokki. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia, Immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Duodecim. 102–109.

Watson, Rachel. Summary of Biochemical Tests: Bile Esculin Agar. University of Wyoming. Verkkodokumentti. <[http://www.uwyo.edu/molb2210\\_lab/info/biochemical\\_tests.htm](http://www.uwyo.edu/molb2210_lab/info/biochemical_tests.htm)>. Luettu 04.09.2012.

Wecker, Lynn – Crespo, Lynn M. - Dunaway, George – Faingold, Carl – Watts, Stephanie 2010. Brody's Human Pharmacology Molecular to Clinical. Mosby. 528–541.

**Herkkyyskorttien sisältämät antibiootit**

Työssämme käytettyjen herkkyyskorttien sisältämät antibiootit ja MIC-alueet.

AST-P580/Stafylokokit	Stafylokokit	Enterokokit	Strepto B
	MIC-alue	MIC-alue	MIC-alue
Benzylpenicillin	0,03-0,5		
Cefoxitin Screen	+/-		
Clindamycin	0,25-8	0,25-8	0,25-8
Erythromycin	0,25-8	0,25-8	0,25-8
Fusidic acid	0,5-32		
Fosfomycin	8-128		
Gentamycin	0,5-16		
Inducible Clindamycin res.	+/-		
Levofloxacin	0,125-8	0,125-8	0,125-8
Linezolid	0,5-8	0,5-8	0,5-8
Moxifloxacin	0,25-8	0,25-8	0,25-8
Murpirocin	2-8		
Nitrofurantoin	16-512	16-512	16-512
Oxacillin	0,25-4		
Rifampicin	0,5-32		
Teicoplanin	0,5-32	0,5-32	0,5-32
Tetracycline	1-16	1-16	1-16
Tigecycline	0,12-2	0,12-2	0,12-2
Tobramycin	1-16		
Trimethoprim/Sulfam.	10-320	10-320	10-320
Vancomycin	0,5-32	0,5-32	0,5-32

AST-P576/Pneumokokki	MIC-alue		MIC-alue
Amoxicillin	0,06-8	Telithromycin	0,25-4
Benzylpenicillin	0,06-2	Tetracycline	1-16
Cefotaxime	0,06-4	Rifampicin	0,25-4
Ceftriaxone	0,06-4	Vancomycin	1-2
Chloramphenicol	2-32		
Erythromycin	0,25-1		
Imipenem	0,03-4		
Levofloxacin	0,5-8		
Linezolid	2-4		
Moxifloxacin	0,25-4		
Ofloxacin	1-8		
Pristinamycin	2-4		
Quinupristin/Dalfopristin	0,25-4		
Trimethoprim/Sulpham.	10-320		
Sparfloxacin	0,125-4		

AST-ST01/Streptokokit	MIC-alue	Streptococci Interpreted		
		<i>β-haemolytic</i>	Viridans	<i>Str.pneumoniae</i>
Ampicillin	<0,25–16	No	Yes	Yes
Benzylpenicillin	<0,06-8	Yes	Yes	Yes
Cefotaxime	<0,12-8	Yes	Yes	Yes
Ceftriazone	<0,12-8	Yes	Yes	Yes
Clindamycin	<0,25-1	Yes	Yes	Yes
Erythromycin	0,12-8	Yes	No	Yes
Levofloxacin	<0,25–16	Yes	No	Yes
Linezolid	<2-8	Yes	No	Yes
Tetracycline	<0,25–16	Yes	No	Yes
Trimethoprim/Sulpham.	<10–320	Yes	No	Yes
Vancomycin	<0,12-8	Yes	Yes	Yes
ICR test	NEG/POS		No	No

AST-586/Enterokokit	Stafylokokit	Enterokokit	Strepto B
	MIC-alue	MIC-alue	MIC-alue
Ampicillin		2-32	0,25–16
Ampicillin/Sulbactam	2/1-32/16	2/1-32/16	2/1-32/16
Benzylpenicillin		0,12–64	0,12–64
Cefuroxime	1-64	1-64	1-64
Clindamycin	0,25-8	0,25-8	0,25-8
Erythromycin	0,25-8	0,25-8	0,25-8
Gentamicin High level	NA	+/-	NA
Imipenem	1-16	1-16	1-16
Levofloxacin	0,125-8	0,125-8	0,125-8
Linezolid	0,5-8	0,5-8	0,5-8
Moxifloxacin	0,25-8	0,25-8	0,25-8
Nitrofurantoin	16–512	16–512	16–512
Quinupristin/Dalfopristin	0,25–16	0,25–16	0,25–16
Streptomycin High level	NA	+/-	NA
Teicoplanin	0,5-32	0,5-32	0,5-32
Tetracycline	1-16	1-16	1-16
Tigecycline	0,12-2	0,12-2	0,12-2
Trimetoprim/Sulfam.	10–320	10–320	10–320
Vankomycin	0,5-32	0,5-32	0,5-32

(BioMérieux 2010.)

[illegible][illegible][illegible]

Antibiootit	<i>S.epidermidis</i>		<i>S.epidermidis</i>		<i>S.haemolyticus</i>		<i>S.haemolyticus</i>		<i>S.epidermidis</i>	
	T117001 (ID 99%)		T117018 (ID 99%)		T117019 (ID 99%)		T117041 (ID 97%)		T117042 (ID 95%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Erytromysiini	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S
Fusidiini	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Klindamysiini	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S
Levofloksasiini	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
Linezolidi	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Oksasilliini	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
Rifampisiini	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
Tetrasykliini	S	S	I	I	I	R	I	R	R	I
Trim/Sulf	S	S	S	S	R	R	R	R	I	S
Vankomysiini	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

MRSA/AST-P580										
Antibiootti	T44260 (ID 99%)		T47156 (ID 99%)		T110889 (ID 99%)		T111989 (ID 99%)		T112635 (ID 94%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Erytromysiini	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
Fusidiini	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S
Klindamysiini	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Levofloksasiini	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
Mupiroysiini	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Oksasilliini	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
Rifampisiini	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tobramysiini	S	S	S	S	—	S	—	S	—	S
Trim/Sulf	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
Vankomysiini	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Antibiootti	T112799 (ID 99%)		T114535 (ID 99%)		T116704 (ID 99%)		T116921 (ID 95%)		T116986 (ID 99%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Erytromysiini	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S
Fusidiini	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Klindamysiini	S	S	S	S	R	*R	S	S	S	S
Levofloksasiini	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S
Mupiroysiini	S	S	—	S	S	S	S	S	S	S
Oksasilliini	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rifampisiini	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
Tobramysiini	—	S	—	R	—	S	—	S	—	S
Trim/Sulf	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Vankomysiini	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

\* indusoituva klindamysiiniresistenssi



[illegible][illegible]

[illegible]

**Streptokokkikortti AST-ST01 tulokset**

<b>Streptokokit/A-ryhmä/AST-ST01</b>								
Antibiootti	T110413 (ID 99%)		T114985 (ID 97%)		T115490 (ID 95%)		T115931 (ID 99%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Erytromysiini	R	R	R	R	R	R	S	S
Klindamysiini	R	R	R	*R	R	*R	S	S
Penisilliini	S	S	S	S	S	S	S	S
Vankomysiini	S	S	S	S	S	S	S	S

\* indusoituva klindamysiiniresistenssi

<b>Streptokokit/B-ryhmä/AST-ST01</b>								
Antibiootti	T109353 (ID 98%)		T109833 (ID 99%)		T111976 (ID 97%)		T105067 (ID 97%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Erytromysiini	R	R	S	S	S	S	S	I
Klindamysiini	S	*R	S	S	S	S	R	R
Penisilliini	S	S	S	S	S	S	S	S
Vankomysiini	S	S	S	S	S	S	S	S

\* indusoituva klindamysiiniresistenssi

<b>Streptokokit/C- ja G-ryhmä/AST-ST01</b>								
Antibiootti	<i>Str.dysgalactiae</i>		<i>Str.mitis/Str.oralis</i>		<i>Str.dysgalactiae</i>		<i>Str.equi</i>	
	T67627 (ID 98%)		T101121 (ID 96%)		T106432 (ID 98%)		T106764 (ID 99%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Ampisilliini	S	—	I	I	S	—	—	—
Erytromysiini	S	S	R	R	R	R	S	I
Klindamysiini	S	S	R	R	R	R	R	R
Penisilliini	S	S	—	I	S	S	S	S
Vankomysiini	S	S	S	S	S	S	S	S

Antibiootti	<i>Str.dysgalactiae</i>		<i>Str.dysgalactiae</i>		<i>Str.dysgalactiae</i>	
	T113138 (ID 95%)		T115610 (ID 96%)		T115712 (ID 94%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Ampisilliini	S	—	S	—	S	—
Erytromysiini	R	R	R	R	R	R
Klindamysiini	S	*R	R	R	R	R
Penisilliini	S	S	S	S	S	S
Vankomysiini	S	S	S	S	S	S

\* indusoituva klindamysiiniresistenssi

Streptokokit/Anginosus- ja Viridans -ryhmä/AST-ST01								
Antibiootti	<i>Str.constellatus</i>		<i>Str.mutans</i>		<i>Str.mitis/Str.oralis</i>		<i>Str.mutans</i>	
	T101460 (ID 97%)		T103128 (ID 97%)		T107883 (ID 93%)		T110826 (ID 90%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Ampisilliini	S	S	S	S	R	R	S	S
Erytromysiini	S	S	S	S	R	R	R	R
Klindamysiini	S	S	S	S	S	S	R	R
Penisilliini	I	S	S	S	R	R	S	S
Vankomysiini	S	S	—	S	S	S	S	S

Antibiootti	<i>Str.anginosus</i>		<i>Str.anginosus</i>	
	T108982 (ID 97%)		T111479 (ID 96%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Ampisilliini	S	—	S	—
Erytromysiini	I	—	R	—
Klindamysiini	S	—	R	—
Penisilliini	S	—	S	—
Vankomysiini	S	—	S	—

**Enterokokkikortti AST-P586 tulokset**

<i>Enterococcus faecalis</i> /AST-P586										
Antibiootit	T107152 (ID 99%)		T110627 (ID 99%)		T114942 (ID 99%)		T115667 (ID 99%)		T116022 (ID 99%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Ampisilliini	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicin-high	–	R	R	R	–	R	–	S	–	S
Imipenemi	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Linezolidi	R	R	S	S	S	S	–	S	–	S
Nitrofurantoiini	–	S	S	S	–	S	S	S	S	S
Teikoplaniini	–	S	S	S	–	S	–	S	–	S
Tigesykliini	–	S	S	S	S	S	–	S	–	S
Vankomysiini	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Antibiootit	T116068 (ID 99%)		T116069 (ID 99%)		T116350 (ID 99%)		T116915 (ID 99%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Ampisilliini	S	I	S	S	S	S	S	S
Gentamicin-high	–	R	–	R	R	R	S	S
Imipenemi	R	S	S	S	I	S	S	S
Linezolidi	S	S	S	S	S	S	S	S
Nitrofurantoiini	–	S	–	S	–	S	–	S
Teikoplaniini	–	S	–	S	–	S	–	S
Tigesykliini	S	S	–	S	–	S	–	S
Vankomysiini	S	S	S	S	S	S	S	S

<b>Enterococcus faecium/AST-P586</b>										
Antibiootit	T91920 (ID 99%)		T107447 (ID 91%)		T107715 (ID 91%)		T110565 (ID 93%)		T112693 (ID 91%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Ampisilliini	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
Gentamicin-high	R	R	S	S	–	R	–	S	–	S
Imipenemi	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R
Linezolidi	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
Teikoplaniini	S	S	–	S	S	S	–	S	–	S
Tigesykliini	–	S	S	S	–	S	–	S	S	S
Vankomysiini	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Antibiootit	T115937 (ID 96%)		T116030 (ID 95%)		T116374 (ID 97%)		T116614 (ID 96%)		T116655 (ID 95%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Ampisilliini	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S
Gentamicin-high	–	S	S	S	R	R	S	S	S	TRM
Imipenemi	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S
Linezolidi	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Teikoplaniini	–	S	–	S	–	S	–	S	–	S
Tigesykliini	–	S	–	S	–	S	–	S	–	S
Vankomysiini	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Antibiootit	T116902 (98 %)		T116034 (ID 89 %)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Ampisilliini	R	*R	S	S
Gentamicin-high	S	S	–	S
Imipenemi	R	R	I	S
Linezolidi	S	S	S	S
Teikoplaniini	–	S	–	S
Tigesykliini	–	S	–	S
Vankomysiini	S	S	S	S

<b>VRE/AST-P586</b>										
Antibiootit	<i>E. faecium</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. gallinarum</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. casseliflavus</i>	
	T54851 (ID 99 %)		T55686 (ID 90 %)		T69204 (ID 99 %)		T91999 (ID 99 %)		T103161 (ID 96%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Ampisilliini	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
Gentamicin-high	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
Imipenem	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
Linezolidi	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Teikoplaniini	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
Tigesykliini	S	S	S	S	–	S	–	S	–	S
Vankomysiini	R	R	R	R	I	*R	R	R	I	R

Antibiootit	<i>E.casseliflavus</i>		<i>E.faecium</i>		<i>E.faecalis</i>		<i>E.casseliflavus</i>		<i>E.faecium</i>	
	T107099 (ID 98%)		T108931 (ID 96%)		T111873 (ID 99%)		T111940 (ID 89%)		T115179 (ID 96%)	
	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek	mm/MIC	Vitek
Ampisilliini	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R
Gentamicin-high	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
Imipenem	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R
Linezolidi	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Teikoplaniini	-	S	S	S	R	S	-	S	R	R
Tigesykliini	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
Vankomysiini	S	*R	S ripsu/R	S	R	R	S	*R	R	R





bioMerieux Customer:  
System #:

# Laboratory Report

Printed May 24, 2012 08:25 EEST  
Printed by: labadmin

Patient Name:  
Isolate Group: T112799-1

Patient ID:

Bionumber: 010402043763271  
Selected Organism: Staphylococcus aureus

Comments:	

Identification Information	Card: GP	Lot Number: 242234140	Expires: May 12, 2013 13:00 EEST
	Completed: May 23, 2012 18:08 EEST	Status: Final	Analysis Time: 4.25 hours
Selected Organism	99% Probability Staphylococcus aureus		
	Bionumber: 010402043763271	Confidence: Excellent identification	
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			

Susceptibility Information	Card:	AST-P580	Lot Number:	360233810		Expires:	May 9, 2013 13:00 EEST	
	Completed:	May 23, 2012 22:12 EEST		Status:	Final		Analysis Time:	8.25 hours
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation			
Cefoxitin Screen	POS	+	Teicoplanin	<= 0.5	S			
Benzylpenicillin	>= 0.5	R	Vancomycin	1	S			
Oxacillin	>= 4	R	Tetracycline	<= 1	S			
Gentamicin	<= 0.5	S	Tigecycline	<= 0.12	S			
Tobramycin	<= 1	S	Fosfomycin	<= 8	S			
Levofloxacin	0.25	S	Nitrofurantoin					
Moxifloxacin	<= 0.25	S	Fusidic Acid	<= 0.5	S			
Inducible Clindamycin Resistance	NEG	-	Mupirocin					
Erythromycin	>= 8	R	Rifampicin	<= 0.5				
Clindamycin	<= 0.25	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	<= 10	S			
Linezolid	2	S						

+ = Deduced drug \* = AES modified \*\* = User modified

AES Findings:	Last Modified: Apr 23, 2012 12:09 EEST	Parameter Set: HUSLAB EUCAST+EUCAST
Confidence Level:	Consistent	
Phenotype:	BETA-LACTAMS	MODIFICATION OF PBP (mecA)